



Faculté de Médecine  
Département de Biochimie

**Caractérisation des protéines virales impliquées dans la réplication et  
la maturation de l'ARN des virus de la famille des *Flaviviridae*.**

Par Mme Ines Lilia Benzaghoul

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

8 septembre 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-25944-3*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-25944-3*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## **REMERCIEMENTS**

Je dédie ce mémoire à ma mère qui, malgré la distance, a su me soutenir moralement et m'encourager. Je la remercie pour ses précieux conseils qui m'ont permis de traverser toutes les difficultés, avec beaucoup de dignité, tout au long du parcours. Je dédie aussi mon mémoire à toute ma famille et à tous mes amis qui ont cru en moi et leur confiance est la source de ma motivation.

Je remercie les membres du laboratoire pour leurs contributions aux résultats illustrés dans les articles.

Je remercie en particulier mon directeur de recherche Dr. Martin Bisaillon qui m'a donné la chance de continuer mes études de Maîtrise et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il est, aussi, indispensable de souligner la qualité de l'enseignement et l'encadrement prodigués par mon directeur de recherche dont j'ai bénéficié pendant ces deux années de Maîtrise.

Mes remerciements aux membres du jury. Dr François Bachand et Dre. Nancy Dumais pour les corrections apportées au mémoire et leurs commentaires constructifs.

## TABLE DES MATIÈRES

<b><u>LISTE DES FIGURES</u></b> .....	V
<b><u>LISTE DES TABLEAUX</u></b> .....	VIII
<b><u>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</u></b> .....	IX
<b><u>RÉSUMÉ</u></b> .....	X
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	I
1. Les <i>Flavivirus</i> , épidémiologie et mode de réplication.....	I
1.1. Le virus du Nil occidental .....	I
1.1.1. Génome du virus du Nil occidental.....	3
1.1.2. Réplication du virus du Nil occidental.....	4
1.1.3. Les protéines virales structurales.....	9
1.1.4. Les protéines virales non structurales.....	9
1.1.5. Cause de la mort cellulaire suite à une infection au virus du Nil occidental et immunité.....	13
1.2. Le virus de l'hépatite C .....	14
1.2.1. Génome du virus de l'hépatite C.....	15
1.2.2. Réplication du virus de l'hépatite C.....	16
1.2.3. Les protéines virales structurales.....	18
1.2.4. Les protéines virales non structurales.....	19
1.2.4.1. L'ARN polymérase NS5B du virus de l'hépatite C.....	21
1.2.5. Conséquence de l'infection de la cellule par le virus de l'hépatite C et immunité.....	24



2. Maturation de l'ARNm et synthèse de la structure coiffe.....	25
2.1. Rôle de la structure coiffe.....	27
2.2. La structure coiffe chez les virus.....	28
3. Hypothèse et objectif recherche.....	30
3.1. Le virus du Nil occidental.....	<b>30</b>
3.2. Le virus de l'hépatite C.....	32

## **RÉSULTATS**.....34

### ARTICLE 1: Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase

Abstract.....	36
Introduction.....	38
Materials and methods.....	41
Results.....	48
Discussion.....	57
Acknowledgements.....	63
References.....	64
Figure legends.....	71

### ARTICLE 2: Effect of Metal Ion Binding on the Structural Stability of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase

Summary.....	86
Introduction.....	87
Materials and methods.....	89
Results.....	94

Discussion.....	102
References.....	107
Acknowledgements.....	111
Figure legends.....	112

## **DISCUSSION**.....124

1. Détermination de l'énergie de la liaison de l'ARN-triphosphatase du virus du Nil occidental à l'ARN.....124
  - 1.1. Caractérisation de l'activité ATPase/hélicase de la protéine NS3.....124
  - 1.2. Changement de la conformation de la protéine NS3 suite à la liaison au  $Mg^{2+}$  et stabilité.....135
  - 1.3. Inhibition de l'activité ATPase/hélicase.....142
2. Caractérisation de l'effet des ions métalliques sur la stabilité de la polymérase du virus de l'hépatite C.....144

## **CONCLUSION**.....148

## **RÉFÉRENCES**.....150

## **LISTES DES FIGURES**

### **INTRODUCTION**

Figure 1. Génome du virus du Nil occidental.....	4
Figure 2. Réplication du virus du Nil occidental dans la cellule hôte.....	7
Figure 3. Génome du virus de l'hépatite C.....	15
Figure 4. Réplication du virus de l'hépatite C dans la cellule hôte.....	17
Figure 5. Cristal de la protéine NS5B.....	23
Figure 6. Structure coiffe de l'ARN.....	26

### **RÉSULTATS**

#### **ARTICLE 1: Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase**

Figure 1. Expression, purification, and RNA-triphosphatase activity of recombinant in WNV NS3 protein.....	76
Figure 2. Titration of NS3 with RNA.....	77
Figure 3. Characterization of the interaction between RNA and NS3.....	78

Figure 4. Structural consequences of RNA binding to the NS3 protein.....	79
--	----

Figure 5. Binding of ANS to the NS3 protein duing urea denaturation.....	80
--	----

Figure 6. Unfolding equilibrium of the NS3 protein.....	81
---	----

Figure 7. Three-dimensional model of the WNV NS3 protein.....	82
---	----

## ARTICLE 2: Effect of Metal Ion Binding on the Structural Stability of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase

Figure1. Expression, purification and fluorescence properties of the HCV RNA polymerase.....	117
---	-----

Figure 2. GdmHCl-induced unfolding equilibrium of the NS5B protein.....	118
---	-----

Figure 3. Thermal denaturation of the HCV RNA polymerase.....	119
---	-----

Figure 4. Thermodynamic parameters of the interaction between $Mg^{2+}$ ions and the NS5B protein.....	120
---	-----

Figure 5. Binding of ANS to the HCV RNA polymerase during urea denaturation...	121
--	-----

Figure 6. Stern- Volmer plots for the quenching of the intrinsic fluorescence of the NS5B protein by acrylamide.....	122
---	-----

Figure 7. Characterization of the HCV RNA polymerase alanine mutants.....	123
---	-----

## DISCUSSION

Figure 1. Caractérisation de l'activité ATPase.....	127
---	-----

Figure 2. Test de l'activité hélicase.....	132
--	-----

Figure 3. Détermination de la spécificité de l'activité hélicase au substrat et polarité.....	134
--	-----

Figure 4. Effet de la liaison du $Mg^{2+}$ sur la structure de la protéine NS3.....	137
---	-----

Figure 5. Dénaturation de la protéine NS3 au Gdm-HCl.....	138
---	-----

Figure 5. Dénaturation de la protéine NS3 au Gdm-HCl.....	140
---	-----

Figure 7. Dénaturation thermique de la protéine NS3.....	141
--	-----

Figure 8. Inhibition de l'activité ATPase et hélicase.....	143
--	-----

## **LISTES DES TABLEAUX**

### **RÉSULTATS**

#### **ARTICLE 1**

TABLEAU I : Thermodynamic unfolding parameters of the WNV NS3 protein measured Thermal denaturation.....	75
---	----

#### **ARTICLE 2**

TABLEAU I : Thermodynamic unfolding parameters measured by equilibrium Guanidium hydrochloride denaturation.....	115
---	-----

TABLEAU II : Quenching of the HCV RNA polymerase intrinsic fluorescence by Acrylamide.....	116
---	-----

### **DISCUSSION**

TABLEAU I : Détermination des constantes d'affinité ( $K_m$ ), $K_{cat}$ et des constantes de spécificités à l'ARN et aux nucléotides.....	131
---	-----

TABLEAU II : Paramètres thermodynamiques de dénaturation par Gdn-HCl.....	139
---	-----

TABLEAU III : Paramètres thermodynamiques de dénaturation par Gdn-HCl.....	140
--	-----

TABLEAU IV : Paramètres thermodynamiques de dénaturation de la protéine NS3 effectuée par dénaturation thermique.....	141
--	-----

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

A	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
Asp	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
CTP	cytidine triphosphate
dATP	désoxyadénosine triphosphate
GMP	guanosine monophosphate
GTP	guanosine triphosphate
IgG	immunoglobuline G
IgM	immunoglobuline M
INF	interféron
K <sub>m</sub>	constante de Michaëlis-Menten
K <sub>cat</sub>	constante catalytique
K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>	constante de spécificité
NTP	nucléoside triphosphate
pH	potentiel hydrogène
RE	réticulum endoplasmique
SF2	superfamille 2
U	uracile

## Résumé

**Mémoire de Maîtrise présenté par  
Mme Ines Lilia Benzaghoul  
Le 25 avril 2006**

Ce projet de recherche vise à caractériser certaines protéines impliquées dans le métabolisme des ARN des virus appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Dans un premier temps, des paramètres de stabilité de l'ARN polymérase du virus de l'hépatite C ont été étudiés. Selon des travaux antérieurs, l'importance du rôle des ions  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  pour l'activité enzymatique de la polymérase virale a été démontré. Afin d'élucider le rôle de ces ions dans l'activité de la protéine ainsi que le changement de conformation due à la liaison des ions en solution, nous avons utilisé la spectroscopie à fluorescence pour évaluer l'interaction entre la protéine et divers ions métalliques. Cette technique, combinée à des essais de dénaturation chimique et thermique, permet de démontrer l'importance des ions métalliques dans la stabilité de la protéine. Nos essais démontrent clairement que la protéine possède une stabilité accrue lorsqu'elle est liée à des ions métalliques. De plus, nos données indiquent que le site actif de la protéine est plus vulnérable aux agents dénaturants que les autres portions de la protéine et des études de mutagenèse ont confirmé l'identité des résidus impliqués dans la liaison du  $Mg^{2+}$ . Enfin, l'utilisation de sondes fluorescentes nous permet de démontrer l'apparition de changements conformationnels significatifs suite à la liaison des ions métalliques. Des connaissances approfondies sur la réaction catalysée par l'ARN polymérase du virus de l'hépatite C ainsi qu'une meilleure compréhension des propriétés biochimiques de cette protéine devraient éventuellement mener au développement de stratégies antivirales efficaces.



Dans un deuxième temps, une caractérisation de l'activité de la protéine NS3 du virus du Nil occidental a été effectuée afin d'améliorer nos connaissances sur les étapes élémentaires de la réplication de ce virus. La portion carboxy-terminale de la protéine NS3 supporte plusieurs activités : une activité ARN-triphosphatase impliquée dans la synthèse de la structure coiffe ainsi qu'une activité ATPase/hélicase essentielle lors de la réplication de l'ARN viral. Divers paramètres biochimiques et cinétiques des activités ARN-triphosphatase et ATPase ont été estimés afin de déterminer les conditions optimales, notamment, les besoins en ions métalliques des différentes activités. De plus, une caractérisation approfondie de l'enzyme, qui consiste en la détermination des meilleurs substrats de l'activité hélicase a été effectuée. Nos travaux indiquent que la protéine NS3 du virus du Nil occidental possède une forte processivité et déroule l'ARN double brin des extrémités 3' ➔ 5' et de 5' ➔ 3'. Enfin, les changements conformationnels produits lors de la liaison d'ions métalliques, (en occurrence le  $Mg^{2+}$ ) et les différents substrats de la protéine ont été étudiés, ainsi que l'éventuel effet stabilisateur de leur liaison, et ce en utilisant la spectroscopie à fluorescence et le dichroïsme circulaire.

Par ailleurs, les études de caractérisation de la protéine NS3 ont révélé que les activités ARN-triphosphatase et ATPase/hélicase sont inhibées par le tripolyphosphate, une petite molécule qui imite les substrats de la protéine NS3. Le tripolyphosphate pourrait, éventuellement, servir comme modèle pour le développement des agents antiviraux.

Cette étude permet de mieux cerner le mode catalytique et le comportement conformationnel en solution des enzymes des virus de la famille de *Flaviviridae* face

aux différents substrats et co-facteurs, pour finalement mieux cibler leur rôle dans la réplication du virus et ainsi développer des stratégies anti-virales.

## INTRODUCTION

### 1. Les *Flavivirus*, épidémiologie et mode de réplication

Les *Flavivirus* appartiennent à la famille des *Flaviviridae* au même titre que les *Pestivirus* et les *Hepacivirus*. Une des particularités des *Flavivirus*, est que leur génome est constitué d'un simple brin d'ARN linéaire de polarité positive, ayant une taille avoisinante les 11 kilobases et enveloppé par une capside de glycoprotéines. On dénombre 70 virus appartenant à la famille des *Flavivirus* qui se divisent en deux sérogroupes antigéniques (HEINZ *et al.*, 2000).

#### 1.1 Le virus du Nil occidental

Le virus du Nil occidental est un membre du séro groupe du virus de l'encéphalite Japonaise (JVE) qui inclus d'autres virus tels que le virus du Cacipacore, virus de la fièvre jaune, le virus Koutango, le virus de l'encéphalite Murray Valley, le virus de l'encéphalite St-Louis, le virus Usutu et le virus de Yaounde (HEINZ *et al.* 2000 ; SCHERRET *et al.* 2001). En se basant sur la forte homologie des séquences, le virus Kunjin, qui a provoqué de sévères infections endémiques en Australie et en Asie est considéré comme étant un sous-type du virus du Nil occidental. D'ailleurs, il y a deux lignées du virus du Nil occidental qui ont été isolées (lignée 1 et 2). Ce classement est basé sur les séquences des protéines formant l'enveloppe, qui ont subi des mutations ou des délétions (BERTHET *et al.*, 1997).

Le virus du Nil occidental a été découvert en 1937 en Ouganda et sa dispersion à travers le monde est principalement reliée aux déplacements des oiseaux migrateurs qui représentent un réservoir considérable du virus. Les zones les plus touchées sont l'Afrique du Nord, l'Afrique tropicale, le Moyen orient, l'Inde et l'Asie centrale. La plus importante épidémie a été répertoriée en 1974, en Afrique, dans la province du Cape, où le nombre de personnes atteintes est estimé à 3000 individus (MCINTOSH *et al.*, 1976).

Le virus est apparu sur le continent américain, pour la première fois, en 1999 à New York. L'arrivée du pathogène au Québec en 2002, a suscité l'intérêt des autorités compétentes pour contrôler la propagation, ainsi que l'intérêt des scientifiques afin de comprendre le mécanisme par lequel le virus s'introduit et se réplique dans la cellule hôte. Aux États-Unis, depuis 2001, il y eu 3000 cas diagnostiqués et 16 morts ainsi que plusieurs espèces d'oiseaux ont été décimées par le virus. Jusqu'à nos jours, un seul canadien est décédé suite à une infection par le virus du Nil occidental (Agence de santé publique canada). Par ailleurs, le nombre de personnes atteintes aux états unis cette année est alarmant. Plus que 2799 personnes ont été sévèrement atteintes par le virus, dont 122 morts (D'ARCY *et al.*, 2006).

La plupart des *Flavivirus* sont transmis par les arthropodes (ex : maringouins). L'humain et le bétail sont des hôtes accidentels du virus du Nil occidental, leur infection survient suite à des piqûres de moustiques de type *Culex* qui représentent le vecteur

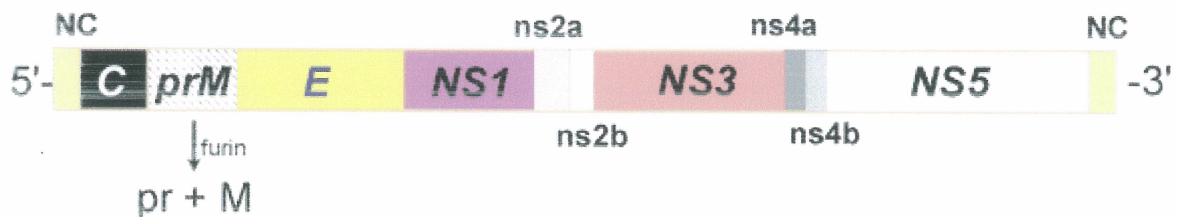
principal du virus. Chez l'humain, le virus peut aussi se contracter par transfusion sanguine ou lors de transplantation d'organe (TURELL *et al.*, 2000).

Le virus montre un degré considérable de similitude de séquence au virus de l'encéphalite japonaise (JE), le virus de l'encéphalite Murray Valley (MVE) et le virus l'encéphalite St-Louis (SLE) qui atteignent le système nerveux central. Le virus du Nil occidental cause la fièvre du Nil occidental appelé aussi la fièvre de la Camargue, qui est une zoonose provoquant des symptômes qui s'apparentent à ceux de la grippe tels que la fièvre, des maux de têtes et des douleurs musculaires. La maladie peut se compliquer d'un syndrome méningé lorsque le virus traverse la membrane hémato-encéphalique, qui peut être curable. Par contre, chez certains individus immunodéprimés la maladie peut évoluer en encéphalite mortelle (KAYE et MOJICA, 2000). Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace pour éliminer le virus. Des études approfondies et ciblées pour une meilleure compréhension du mode de réplication du virus sont donc nécessaires afin de développer des agents anti-viraux et éviter les endémies.

#### **1.1.1. Génome du virus du Nil occidental**

Le génome du virus est un ARN simple brin de polarité positive. Le génome a une taille de 11 029 nucléotides et possède un seul cadre de lecture. Il dispose d'une structure coiffe ( $m^7GpppAmp$ ) à l'extrémité 5' tout comme les ARNm des cellules eucaryotes (CLEAVES et DUBIN, 1979).

A l'inverse d'autres génomes de *Flavivirus*, l'extrémité 3' ne possède pas de queue poly(A) ; elle se termine par un  $\text{CU}_{\text{OH}}$  (BRINTON *et al.*, 1986 ; WENGLER et WENGLER, 1981).



**Figure1 : Génome du virus du Nil occidental**

Le génome du virus du Nil occidental comporte deux régions non-codantes, une à l'extrémité 5' d'une longueur de 96 nucléotides et une autre à l'extrémité 3' d'une taille de 631 nucléotides. Il code aussi pour dix protéines classées en deux catégories: trois protéines structurales: (protéine de la capsid (C), membrane (prM/M) et l'enveloppe (E)) et les protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Figure 1), (RICE *et al.*, 1985).

### 1.1.2. Réplication du virus du Nil occidental

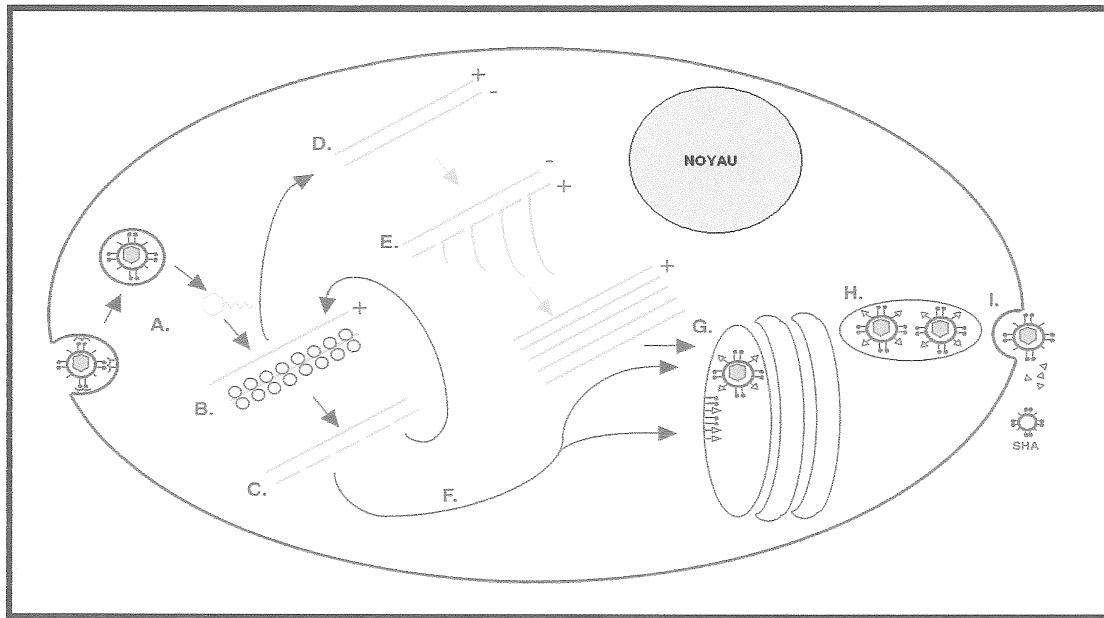
Le virus du Nil occidental se réplique dans plusieurs lignées cellulaires. Notamment, dans les cellules primaires de poulet, de canard, ainsi que dans des cellules embryonnaires de souris et dans la plupart des cellules de singe et de l'humain.

Cependant, l'infection par le virus ne cause pas les mêmes cytopathologies dans les différentes lignées cellulaires (BRINTON, 1982). Il a été démontré que l'infection des neurones par le virus du Nil occidental a un effet cytopathique sur les cellules, alors que l'infection au niveau des cellules mammifères Vero (cellules de reins de singes) a un effet lytique (HUNPERGER et ROEHRIG, 2005).

Des recherches récentes ont démontré que le virus du Nil occidental pénètre la cellule grâce aux récepteurs  $\alpha_v\beta_3$  Integrine. Ces récepteurs se retrouvent sur les membranes des cellules endothéliales. Ils interagissent avec le domaine III de la protéine formant l'enveloppe du virus (la protéine E). Il a été, d'ailleurs, démontré que les acides aminés arginine-glycine-aspartate du domaine III sont importants dans l'interaction avec le récepteur  $\alpha_v\beta_3$  Integrine (CHU et NG, 2004). Une fois que le virus pénètre à l'intérieur de la cellule par endocytose, la réplication se déroule dans le cytoplasme. Dans des études très récentes, les auteurs ont démontré que la réplication du virus pourrait aussi se dérouler dans le noyau en identifiant une localisation nucléaire du complexe de réplication NS3-NS5B (UCHIL *et al.*, 2006). L'enveloppe du virus fusionne dans des vésicules à faible pH et libère le génome préalablement coiffé (HEINZ *et al.*, 2003). L'ARN viral, de polarité positive, est reconnu par la machinerie cellulaire grâce à la structure coiffée en 5' pour être traduit par les ribosomes en une polyprotéine de 3340 acides aminés. La polyprotéine nouvellement synthétisée est clivée par une réaction auto-catalytique en protéines matures par une sérine protéase virale (NS2B-NS3) et des protéases cellulaires pour donner naissance à des protéines

structurales formant l'enveloppe et des protéines non structurales impliquées dans la réplication du génome viral (BRINTON, 2002).





**Figure 2 : Réplication du virus du Nil occidental dans la cellule hôte.**

(A) Entrée du virus dans la cellule grâce à des récepteurs membranaires et libération du génome dans le cytoplasme. (B) Traduction de l'ARN génomique de polarité positive en polyprotéine qui va être clivée en plusieurs protéines. (D) Réplication de l'ARN de polarité positive en ARN de polarité négative. (E) Production de plusieurs copies d'ARN de polarité positive à partir du brin de polarité négative. (F) et (G) Assemblage du virion dans le réticulum endoplasmique. (H) et (I) Transport des virions par la voie sécrétoire de la cellule et relâche des virions dans le milieu extracellulaire.

Suite à la traduction des protéines virales et notamment de la polymérase, l'ARN viral est répliqué en plusieurs copies d'ARN de polarité négative qui vont servir comme matrice pour produire des ARN viraux de polarité positive. Au début de la réplication, il n'y a pas assez de protéines structurales accumulées dans la cellule infectée, donc l'ARN viral de polarité positive alterne entre transcription, traduction et encapsidation (Figure 2). Ceci a été démontré dans le cadre de l'étude de la réplication du virus Kunjin (KHROMYKH *et al.*, 2001). Une fois que la quantité de protéine structurale est suffisante pour encapsider l'ARN viral, l'assemblage du virion se fait par l'intermédiaire de l'association de la membrane rugueuse du réticulum endoplasmique (ER) (NG *et al.*, 2001). Les virions immatures ayant l'hétérodimères Pr et M vont s'accumuler dans des vésicules et sont transportés via la voie sécrétoire de la cellule hôte (HEINZ et ALLISON, 2000 ; WENGLER ET WENGLER, 1989). L'hétérodimère PrM est clivé suite à son passage dans l'appareil de Golgi et la partie carboxy-terminale de la protéine M reste à l'extérieur de l'enveloppe. Une conformation stable du virion est maintenue lors de l'assemblage grâce à l'interaction des protéines PrM et E (HEINZ et ALLISON, 2000). Par la suite, le virion mature est transporté vers la membrane cytoplasmique et relâché dans le milieu extracellulaire par exocytose (MASON, 1989 ; NOWAK *et al.*, 1989).

### **1.1.3 Les protéines virales structurales**

Trois principales protéines forment l'enveloppe du virus. Il y a la protéine C (13 kDa) qui représente la protéine la plus abondante et forme le nucléocapside du virus. La protéine prM est clivée dès la sortie du virus de la cellule. Le segment Pr est sécrété dans le milieu extracellulaire et le segment M (8.5kDa) intègre la partie structurale de l'enveloppe lipidique. La protéine E (51kDa) a un rôle très important dans l'assemblage du virion; elle est aussi impliquée dans la liaison au récepteur cellulaire ainsi qu'à la fusion membranaire et représente une cible à la réponse immunitaire (BRINTON, 2002).

### **1.1.4. Les protéines virales non structurales**

La plupart des protéines non structurales assurent plusieurs fonctions. Toutefois leurs fonctions ne sont que partiellement connues. Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B sont de petites protéines hydrophobes qui ne contiennent pas de motifs conservés connus. Certaines de ces protéines sont impliquées dans l'assemblage du complexe de réplication virale ainsi que dans sa localisation au niveau de la membrane cytoplasmique. La protéine NS2A est synthétisée sous deux formes et sa présence est vitale pour la réplication du virus. La protéine NS2B, exhibe un domaine conservé hydrophobique nécessaire à sa fonction de co-facteur à l'activité serine protéase de la protéine NS3 (CHAMBERS *et al.*, 1993 ; FALGOUT *et al.*, 1993). De plus, cette

portion hydrophobique de NS2B est requise pour l'insertion co-traductionnelle du complexe précurseur NS2B-NS3 à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Quant à la protéine NS4A, elle a été isolée des cellules infectées par le virus Kunjin mais seulement la forme non clivée NS3-NS4A a été retrouvée chez la majorité des cellules infectées (SPEIGHT et WESTAWAY, 1989 ; LINDENBACH et RICE, 1999). La protéine NS4B a été localisée au début de l'infection au niveau de la membrane périnucléaire du réticulum endoplasmique et plus tard a été retrouvée dispersée dans tout le nucléoplasme (WENGLER et WENGLER, 1981). Bien que le rôle exact de ces protéines n'ait pas été encore élucidé, on leur associe un rôle dans l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire. La protéine NS1 (48kDa) est une glycoprotéine contenant 12 cystéines essentielles pour la viabilité du virus. La protéine NS1 est transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique avant le clivage du lien E-NS1. Le monomère NS1 est soluble et hydrophobique mais forme des homodimères et il est associé à la membrane de la cellule infectée. Sa présence a été détectée à la surface des cellules eucaryotes mais pas à la surface des cellules infectées de moustiques (SMITH et WRIGHT, 1985). La protéine NS5 montre au niveau de la portion carboxy-terminale un motif conservé, associé à une activité ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). La protéine NS5 a pour rôle de transcrire l'ARN viral de polarité positive en ARN de polarité négative. Ce dernier va servir comme matrice pour la synthèse des ARNs de polarité positive qui vont être traduits en protéines ou encapsidés. Le domaine amino-terminal de NS5 contient une région ayant une activité méthyltransférase impliquée dans la synthèse de la structure coiffe (KOONIN, 1991). La protéine NS5 est phosphorylée aux résidus sérines par une sérine/thréonine kinase cellulaire et montre

plusieurs états de phosphorylation impliquant la phosphorylation de un ou plusieurs résidus sérines (KAPOOR *et al.*, 1995 ; REED *et al.*, 1998). La forme hyperphosphorylée de NS5 est retrouvée dans le noyau de la cellule infectée et la forme phosphorylée est retrouvée dans le cytoplasme (BUCKLEY *et al.*, 1992). L'état de phosphorylation de la protéine NS5 régule son interaction avec la protéine NS3 (KAPOOR *et al.*, 1995).

La protéine NS3 représente l'objet de nos recherches. Il a été révélé que son extrémité amino-terminal, de 184 résidus, lorsqu'elle est complexée à la protéine NS2B, est responsable d'une fonction serine protéase appartenant à la superfamille des trypsines. L'hétéro-dimérisation du complexe NS3-NS2B crée de nouveaux sites de liaisons à P1 et P2 qui sont les produits de la réaction de clivage protéique.

En se basant sur l'analyse de la séquence, l'extrémité carboxy-terminale de la protéine NS3 montre un motif conservé appelé motif Walker (ou DEAD/H box). Cette signature permet de classer la protéine NS3 dans la superfamille 2 (SF2) des hélicases. Il a été, d'ailleurs, démontré que cette protéine possède une fonction hélicase, nucléoside triphosphatase (NTPase) et ARN-triphosphatase (RTPase). Cette dernière fonction, associée à la synthèse de la structure coiffe, a été découvert par l'équipe de Wengler et Wengler en isolant l'extrémité carboxy-terminale, à partir de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée qui a subi un traitement par la subtilisine (WENGLER et WENGLER, 1991). De plus, le motif Walker comporte deux sites appelés A et B. Le site A est composé d'une succession de résidus hydrophobes suivis

par une séquence conservée GxxxxGGS/T (x correspond à des acides aminés). Il est impliqué directement dans la liaison des phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléoside triphosphate (NTP), alors que le site B, qui est responsable de la chélation du  $Mg^{2+}$ -NTP, comprend un Asp précédé par des résidus hydrophobes. Des mutations apportées aux résidus du motif entraîne la perte de l'activité RTPase et ATPase de la protéine et par conséquent l'activité hélicase (KADARE et HAENNI, 1997). La fonction hélicase de la protéine NS3 est impliquée dans le déroulement de l'ARN viral par la rupture des ponts hydrogènes, en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  de l'adénosine triphosphate (ATP). Des délétions ou des mutations affectant l'activité hélicase de NS3 chez certains *pestivirus* ont démontré son rôle crucial dans la réplication du pathogène dans la cellule.

La protéine NS3 n'interagit pas seulement avec NS2B, elle interagit aussi avec la polymérase. Cette interaction ne fait pas intervenir d'autres protéines mais elle dépend de l'état de phosphorylation de NS5. L'activité de NS3 dans les cellules infectées est probablement régulée par son interaction avec la protéine NS5. Ceci devrait faciliter la coordination de la fonction hélicase, polymérase ainsi que la synthèse de la structure coiffe. Enfin, notons que l'activité de NS3 est également régulée par la protéine NS2B qui est cofacteur pour l'activité protéase (CUI *et al.*, 1998).

### 1.1.5 Cause de la mort cellulaire suite à une infection au virus du Nil occidental et immunité

La mort cellulaire, et notamment des neurones, suite à une infection par le virus du Nil occidental, est due à plusieurs facteurs. Parmi ces facteurs, il y a trois qui sont retenus. La première consiste à la mort cellulaire due à l'infection elle-même par le virus et ce en induisant une apoptose. D'ailleurs il a été démontré que la protéine NS3, à elle seule peut initier la voie des caspase-8 et -3 (RAMANATHAN *et al.*, 2006). La deuxième cause de la mort cellulaire se manifeste par la diminution de l'expression du complexe d'histocompatibilité majeur suite à l'infection par le virus du Nil occidental. Et par conséquent, les neurones infectés deviennent la cible des lymphocytes T cytotoxiques (KESSON et KING, 2001; MOMBURG *et al.*, 2001). Le troisième facteur visent les cellules non infectées qui sont la cible des cytokines toxiques ou des médiateurs inflammatoires résultants de la réponse immunitaire des cellules infectées (SHRESTHA *et al.*, 2003). De ce fait, un système immunitaire sain est nécessaire pour éviter le cas léthal de l'infection par le virus du Nil occidental et particulièrement le système immunitaire humoral incluant les immunoglobulines M (IgM) et les immunoglobulines G (IgG), (DIAMOND *et al.*, 2003 ; ENGLE et DIAMOND, 2003) ainsi que les cellules T à immunité médiée (SHERESTA *et al.*, 2004 ; WANG *et al.*, 2003). Suite à une infection des neurones par le virus du Nil occidental, les interférons INF- $\alpha/\beta$  contrôle l'infection par la restriction de tropisme et préviennent ainsi la mort des neurones infectés (SAMUEL et DIAMOND, 2005).

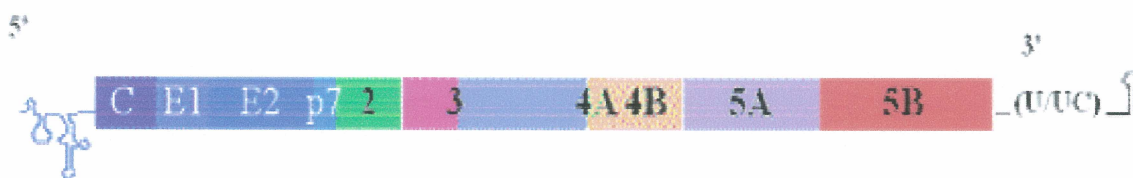
## 1.2. Le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C (HCV) est un *Hepacivirus* appartenant à la grande famille des *Flaviviridae*. Découvert en 1989, le virus portait le nom de virus de l'hépatite non-A non-B (CHOO *et al.*, 1989). Des études ont révélé que 3% de la population mondiale est atteinte par le HCV c'est-à-dire 170 millions d'individus. Parmi les gens atteints par le virus 80% vont développer une infection chronique, 20% de ces patients vont développer une cirrhose et chez 1-5 % des personnes atteintes, leur cirrhose se transformera éventuellement en carcinome hépatocellulaire (HOUGHTON *et al.*, 1996). Contrairement au virus du Nil occidental, le virus de l'hépatite C se transmet principalement par transfusion sanguine. Les autres facteurs de transmission sont les relations sexuelles et la transplantation d'organes. Les séquences des virus d'hépatite C isolés montrent beaucoup de variation et partagent seulement 60% d'homologie. Les virus isolés à travers le monde sont classés en 6 types qui à leurs tour se divisent en sous-types, et ce en se basant sur la séquence du génome (SIMMONDS, 1995). Les types 1-3 du virus sont responsables de la majorité des infections en Europe, tandis que le type 4 est retrouvé en Égypte et au Zaïre. Le type 5 est retrouvé en Afrique du Sud et le type 6 à Hong Kong.



### 1.2.1 Le génome du virus de l'hépatite C

Le génome du virus de l'hépatite C est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'une taille de 9.6 kilobase. Il contient un seul cadre de lecture. Il y a deux régions non codantes (NCR) de 324-341 nucléotides : une à l'extrémité 5' et l'autre à l'extrémité 3' incluant une région poly (U).

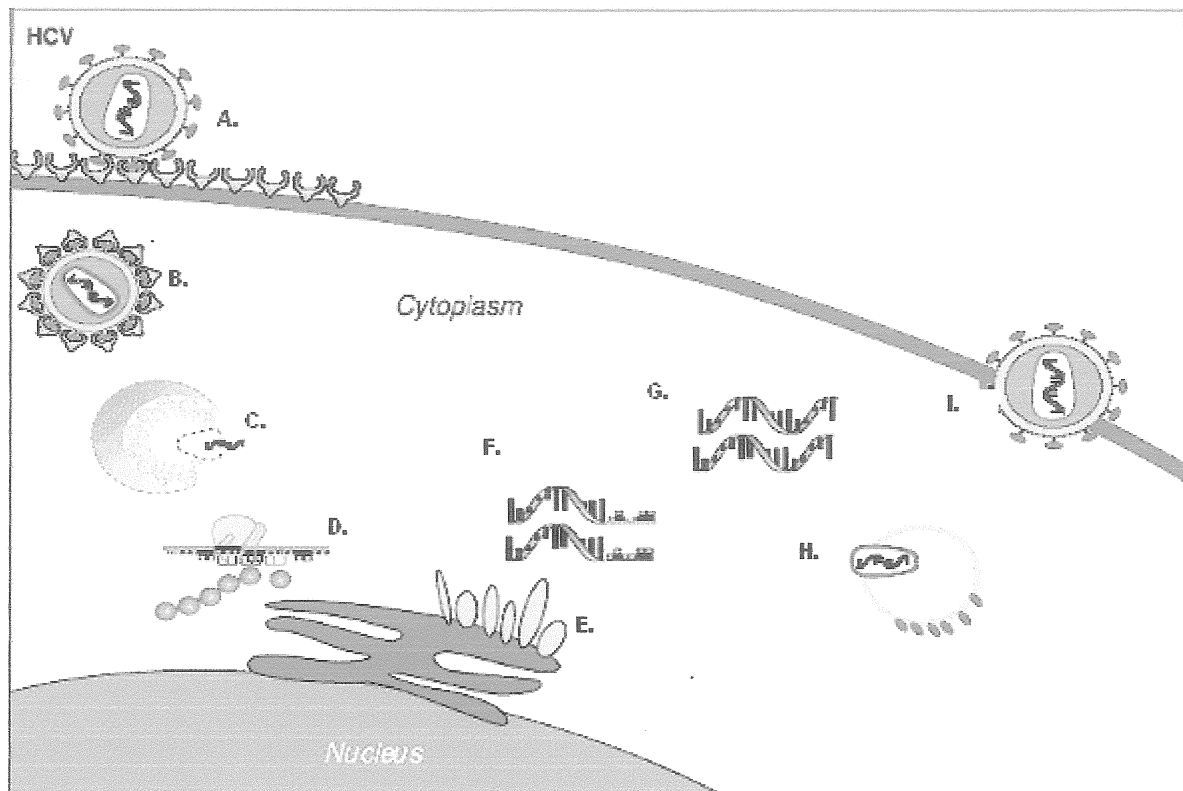


**Figure 3 : Génome du virus de l'hépatite C**

L'extrémité 5' contient une structure IRES (Internal ribosome entry side). Le génome code pour une polyprotéine de 3000 acides aminés. La traduction de la protéine se fait grâce à l'interaction des ribosomes cellulaires avec la structure IRES qui se trouve à la région non-codante 5' (TSUKIYAMA-KOHARA *et al.*, 1992). La polyprotéine subit un clivage co- et post-traductionnel par des protéases cellulaires et virales pour produire au moins dix différentes protéines. Trois protéines structurales (C, E1, E2) et sept protéines non-structurales (p7, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Figure 3).

### 1.2.2 Réplication du virus de l'hépatite C

Les protéines non-structurales du virus de l'hépatite C et l'ARN viral ont été trouvé dans le foie des patients atteints et chez les chimpanzés, chez qui on a inoculé expérimentalement le virus, pour confirmer sa localisation. Ceci a d'ailleurs confirmé le fait que le virus de l'hépatite C se réplique principalement dans le foie (LOHMANN *et al.*, 1999). Il a été aussi démontré que le virus peut se répliquer dans les cellules mononucléaires périphériques sanguines (PBMCs) telles que les cellules de lignée B et T (ESTEBAN *et al.*, 1991). La réplication du virus de l'hépatite C se fait d'une manière très rapide, et il en résulte une apparition d'un grand nombre de mutants et des variations notamment dans une petite région qui code pour la protéine NS5B. Cette variation est due principalement à l'erreur commise par la polymérase virale ARN dépendante (RdRp) lors de la réplication et amène à la subdivision les différents types et sous-types du virus.



**Figure 4 : Réplication du virus de l'hépatite C dans la cellule hôte**

(A) Attachement du virus de l'hépatite C aux récepteurs membranaires de l'hépatocyte. (B) Entrée du virus dans la cellule hôte. (C) Relâche de l'ARN génomique dans le cytoplasme. (D) et (E) Traduction de l'ARN génomique de polarité positive en polyprotéine et clivage de la polyprotéine en protéines matures au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. (F) Réplication de l'ARN de polarité positive en ARN de polarité négative. (G) Production de plusieurs copies du génome à partir du brin négatif. (H) et (I) Assemblage du virion et relâche dans le milieu extracellulaire.

L'entrée du virus à l'intérieur de la cellule se fait grâce au récepteur CD81 qui se trouve sur la membrane de l'hépatocyte. Ce récepteur va interagir avec une grande affinité avec la protéine E2 de l'enveloppe du virus (PILERI *et al.*, 1998). La fonction de la protéine E1 est moins connue mais la présence d'une concentration d'acides aminés hydrophobiques dans sa séquence suggérèrent que la protéine E1 pourrait être impliquée dans la fusion membranaire avec la cellule hôte (FLINT *et al.*, 1999).

Dès l'entrée du virus de l'hépatite C dans la cellule hôte, l'ARN viral de polarité positive est libéré de son enveloppe et traduit en une polyprotéine de 3010 acides aminés. Comme l'ARN génomique ne possède pas de structure coiffe, comparativement aux ARNm cellulaires, la reconnaissance par la machinerie traductionnelle se fait grâce à une structure IRES (Internal ribosome entry side). Cette structure se retrouve entre les nucléotides 40 et 355, qui forment quatre domaines très conservés. Initiée suite à la liaison de la structure IRES aux ribosomes, la traduction de la polyprotéine virale se fait à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (Figure 4). Le clivage se fait d'une manière co- et post- traductionnelle par des protéases virales et cellulaires pour produire dix protéines virales matures qui participent à la réplication du génome viral et à la formation de l'enveloppe (BARTENSCHLAGER et LOHMANN, 2000).

### **1.2.3 Les protéines virales structurales**

Il y a trois protéines identifiées comme étant des protéines constituant la capside virale : la protéine C, la protéine E et la protéine p7. La protéine C ayant un poids

moléculaire de 23 kDa est retrouvée au niveau des membranes cellulaires. Elle fait des interactions homotypiques pour l'assemblage de la particule virale et interagit avec des glycoprotéines pour générer des virions. Elle interagit aussi avec plusieurs protéines cellulaires, et on lui associe plusieurs fonctions de signalisation cellulaire telles que l'inhibition de l'apoptose (LEE *et al.*, 2005) et la carcinogenèse (HERZER *et al.*, 2005). De plus, la protéine C est impliquée dans la régulation de la traduction de l'ARN viral. Les glycoprotéines E1 (31 kDa) et E2 (70 kDa), qui sont les produits de clivage par des protéases cellulaires, forment un complexe et constituent la majeure partie de l'enveloppe du virus (KAITO *et al.*, 1994). Dans la portion N-terminale de E2, il y a une région hypervariable composée de 30 acides aminés tandis que la portion carboxy-terminale est très hydrophobe et lie la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines de l'enveloppe sont glycosylées et conservées dans l'appareil de Golgi jusqu'à la formation de la particule virale. Concernant la troisième protéine structurale p7, peu de choses sont connues sur son rôle exact. Bien qu'on lui associe une fonction viroporine responsable du transport des ions calcium du réticulum endoplasmique au cytoplasme, sa fonction dans le cycle viral est inconnue (GRIFFIN *et al.*, 2005).

#### **1.2.4 Les protéines virales non-structurales**

Le clivage de la portion amino-terminale de la polyprotéine produit des protéines non-structurales impliquées dans la réplication du génome viral (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Ainsi la partie carboxy-terminale de la protéine NS3 est liée à NS2 (23kDa), elle adopte une fonction protéase qui clive entre NS2 et NS3

(GRAKOUÏ *et al.*, 1993). Ce clivage se fait via un mécanisme cystéine-protéase activé par l'interaction de la protéine chaperonne cellulaire Hsp90 (PIERONI *et al.*, 1997 ; THIBEAULT *et al.*, 2001 ; WAXMAN *et al.*, 2001).

La partie amino-terminale de NS3 (70kDa) supporte une activité sérine protéase lorsqu'elle forme un complexe hétéromérique stable avec NS4A et cette activité est responsable du clivage de la polyprotéine. D'ailleurs, la protéine NS4A est aussi responsable de la localisation de la protéine NS3 dans le réticulum endoplasmique (FAILLA *et al.*, 1994). Par contre, la portion carboxy-terminale de NS3 montre un motif conservé, le motif Walker, qui est responsable de l'activité ATPase/hélicase. Cette protéine est classée dans la superfamille 2 des hélicases et joue un rôle important dans la réplication de virus.

De plus, NS4A et NS4B sont des petites protéines composées de 54 acides aminés et sont impliquées dans la régulation de la réplication virale. Elles lient la protéine NS3 pour activer la fonction protéinase ainsi que NS5A (56 kDa) pour réguler son état de phosphorylation. La protéine NS5A est phosphorylée au niveau des résidus sérines de sa portion carboxy-terminale ainsi que dans la région centrale. Quant à la portion amino-terminale, elle est liée à NS4A. La protéine NS5A est impliquée dans la régulation de l'ARN polymérase en interagissant avec elle en fonction de son état de phosphorylation.

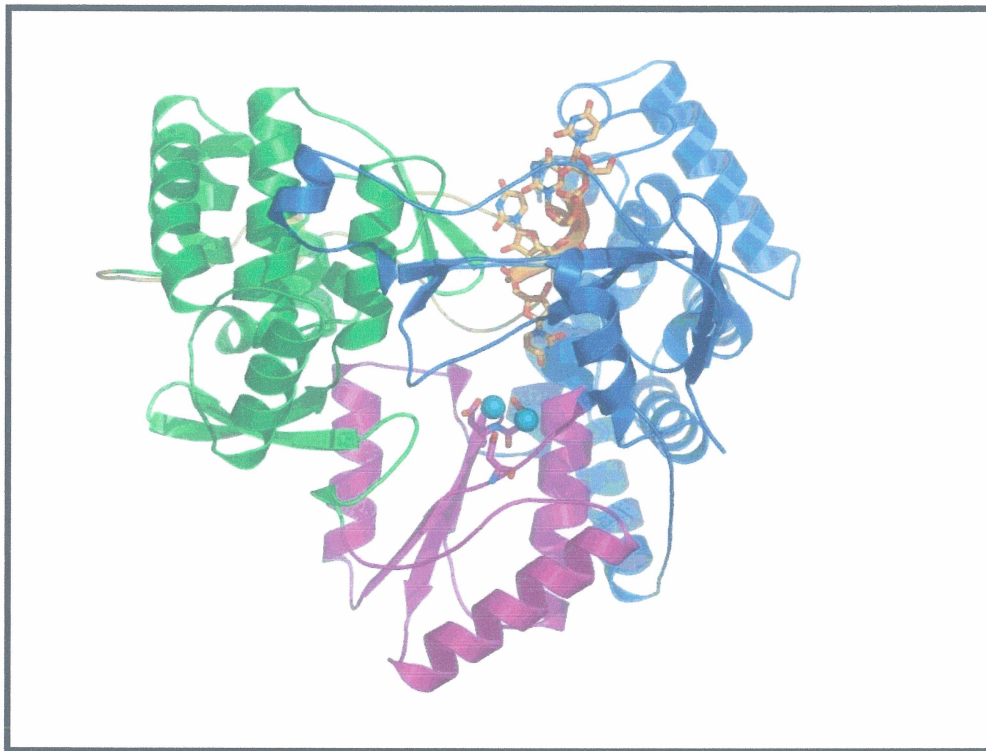
#### 1.2.4.1 L'ARN polymérase NS5B du virus de l'hépatite C

La protéine NS5B (66kDa), supporte une activité ARN-polymérase ARN dépendante (RdRp) identifiée grâce à une séquence conservée Gly-Asp-Asp impliquée dans la liaison de l'ion  $Mg^{2+}$ . En effet, cette protéine est responsable de la synthèse du brin complémentaire de l'ARN viral en utilisant le génome en tant que matrice (PENIN *et al.*, 2004). Des études précédentes ont démontré la capacité de NS5B de répliquer le génome de HCV en entier *in vitro* sans avoir recours à des co-facteurs viraux et cellulaires (LESBURG *et al.*, 2000). La portion carboxy-terminale de la protéine a permis de localiser la protéine au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique du coté cytosolique (SCHMIDT-MENDE *et al.*, 2001).

La protéine NS5B a été précédemment cristallisée (LESBURG *et al.*, 1999) et la visualisation de la structure de la protéine permet une meilleure compréhension de son mécanisme d'action et de ses interactions. La conformation de NS5B n'échappe pas à la règle qui prévaut pour la structure 3D des polymérases antérieurement identifiées. La forme du domaine actif ressemble à une main droite divisée en trois sous-domaines: les doigts, la paume et le pouce. Contrairement aux autres polymérases connues, la protéine NS5B présente une connexion entre le domaine du doigt et le pouce qui ferme le site actif de l'enzyme. Ceci, laisse suggérer que la translocation de l'ARN se fait grâce à un mouvement coordonné du pouce et des doigts. La fonction du domaine de la paume est de former un centre catalytique impliqué dans la réaction de transfert de nucléotides. Ce domaine contient des résidus très conservés, des acides aspartiques qui lient les ions

$Mg^{2+}$  (Figure 5). Selon des observations qui ont été faites suite à la cristallisation de la protéine NS5B de l'hépatite C en présence d'une concentration saturante de  $Mn^{2+}$  et de nucléotides (ATP, GTP, CTP), il a été établi que la polymérase interagit avec deux ions. Les ions  $Mn^{2+}$  sont coordonnés par les acides aminés Asp220, -318 et 386 des motifs conservés A et C de la polymérase. Le premier ion observé est coordonné par les trois phosphates du nucléotide et le deuxième ion interagit probablement avec le phosphate  $\alpha$  du dernier nucléotide à l'extrémité 3'OH de l'ARN nouvellement synthétisé. Les chaînes latérales de Asp220 et de Asp318 forment un pont entre les deux ions métalliques, alors que l'Asp319 interagit avec le deuxième ion. De plus, d'autres observations ont été faites par la même équipe concernant l'importance de la présence de l'ion divalent dans le site catalytique. Ce site est plus souvent occupé par les ions et ceci suggère l'effet stabilisateur des ions et l'augmentation de l'affinité des nucléotides initiateurs au site actif de l'enzyme (BRESSANELLI *et al.*, 2002).





**Figure 5 : Cristal de la protéine NS5B**

La protéine NS5B liant un brin d'ARN, un nucléotide et 2 ions métalliques au site actif.

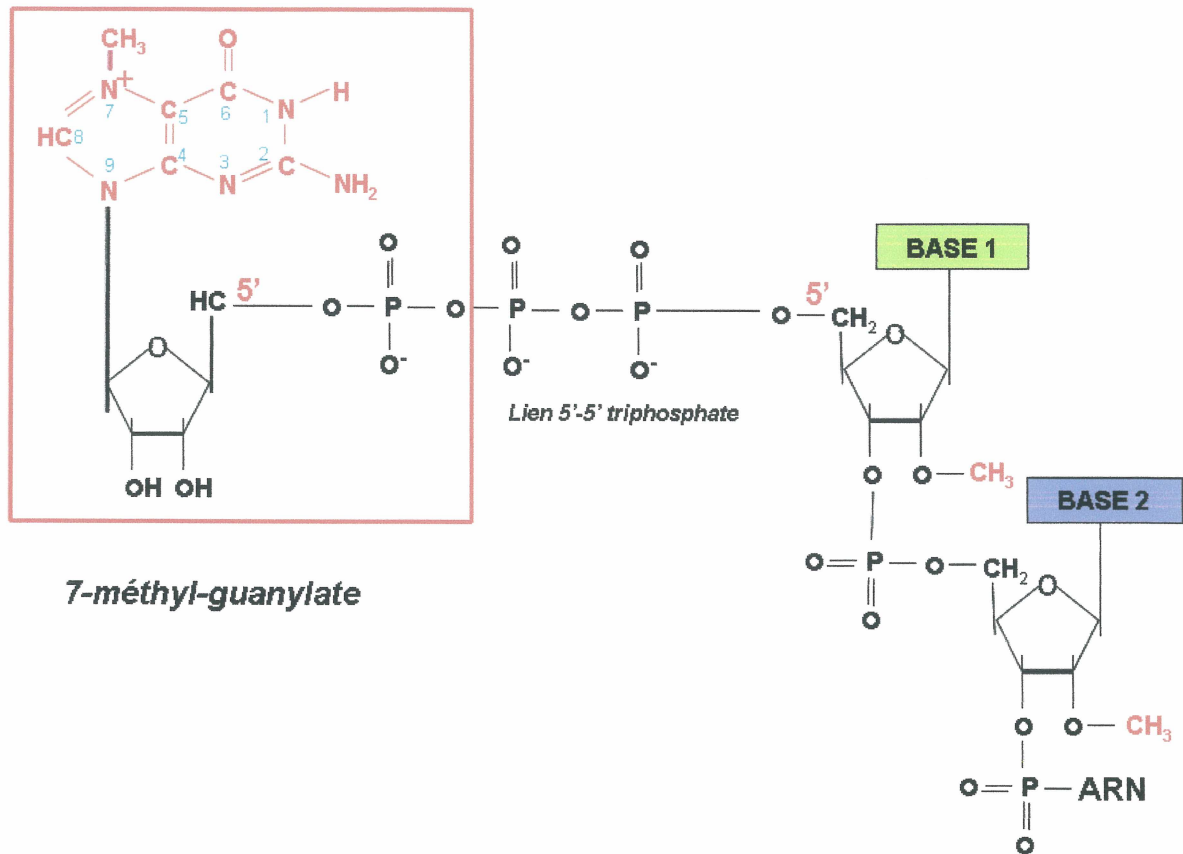
<http://www.wadsworth.org/resnres/bios/jaeger.htm>

### **1.2.5 Conséquence de l'infection de la cellule par le virus de l'hépatite C et immunité**

Suite à une infection par les virus, les cellules infectées déclenchent des signaux engendrant la synthèse des interférons  $\alpha/\beta$  qui représentent la première réponse immunitaire suite à une infection virale. Le virus de l'hépatite C échappe au système immunitaire avec des stratégies lui permettant de se répliquer et de se propager et ce, en interférant avec le processus de signalisation par la modulation des effecteurs ainsi que par la variation du génome viral par des mutations. Ces événements diminuent la synthèse des interférons  $\alpha/\beta$  et par conséquent la persistance de l'infection du virus de l'hépatite C. Le traitement disponible qui tente à supporter le système immunitaire est l'interféron  $\alpha$  combiné au Ribavirin, un analogue de guanosine. Cette stratégie ne donne pas, toutefois, des résultats concluants vu la diversité des souches virales. L'infection par le virus de l'hépatite C n'induit pas l'apoptose des cellules hôtes et le mécanisme de persistance du virus n'est pas tout à fait élucidé (GALE et FOY, 2005).

## 2. Maturation de l'ARNm et synthèse de la structure coiffe

Chez les eucaryotes, les ARNm sont exclusivement transcrits par l'ARN-polymérase II qui initie les étapes de la synthèse de la structure coiffe. Il a été démontré que cette synthèse se fait d'une manière co-transcriptionnelle, c'est-à-dire dès l'apparition des 21-30 premiers nucléotides. Cependant, les ARN synthétisés par la polymérase I et II ne présentent pas de structure coiffe. En effet, la partie carboxy-terminale de l'ARN-polymérase II possède une répétition d'une séquence conservée YSPTSPS (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) dont l'état de phosphorylation permet le recrutement des enzymes impliquées dans la synthèse de la structure coiffe (CHO *et al.*, 1997). Cette structure se caractérise par une liaison 5'-5' phosphate d'un résidu guanylate méthylé en position N-7 au premier nucléotide de l'ARN nouvellement synthétisé (Figure 6).



**Figure 6 : Structure de la coiffe d'ARN**

La synthèse de la structure coiffe implique plusieurs activités enzymatiques : i) l'ARN-5'-triphosphatase qui a pour rôle de cliver la liaison  $\beta$ - $\gamma$  de l'extrémité triphosphorylée de l'ARN naissant et libérer le phosphate gamma pour générer une extrémité 5' diphosphorylée (MOSS *et al.*, 1977) ; ii) l'ARN-guanylyltransférase ajoute un résidu GMP au premier nucléotide de l'ARN par un lien caractéristique 5'-5' (FURUICHI *et al.*, 1976) ; iii) l'ARN (guanine-7)-méthyltransférase méthyle le résidu guanine en position N-7. Notons qu'une autre ARN (nucléosie-2'-O)-méthyltransférase va méthyle les nucléotides adjacents (varie d'un organisme à un autre). Contrairement

aux trois premières étapes qui se déroulent dans le noyau, la dernière méthylation va, cependant, se faire dans le cytoplasme (PERRY, 1981).

## 2.1. Rôle de la structure coiffe

La structure coiffe joue un rôle considérable dans le métabolisme de l'ARNm tels que la stabilité, l'épissage, le transport et la traduction. Des études antérieures ont démontré que la présence de la structure coiffe à l'extrémité des ARNm augmentait leur demi-vie (FURUICHI *et al.*, 1977). De ce fait, la présence du groupement guanosine est importante dans la protection des ARNm contre les nucléases cellulaires, surtout au niveau de leur extrémité 5'. Mis à part l'importance de la structure coiffe dans la stabilité de l'ARNm, elle est aussi impliquée dans l'initiation de la traduction. Il a été vérifié que le groupement  $m^7G$  à l'extrémité 5' des ARNm est indispensable pour le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome (BOTH *et al.*, 1976 ; VON DER HARR *et al.*, 2006). D'ailleurs, des facteurs de traduction tels que la protéine eIF-4 (Cap binding complex) lient spécifiquement la structure coiffe (ROZEN *et al.*, 1990 ; GINGRAS *et al.*, 1999) et recrute d'autres facteurs qui vont lier la queue poly(A) (ex :PABP (Poly(A) binding protein) et donner à l'ARNm une forme de boucle. Ce nouvel aspect de l'ARNm, résultant de l'interaction de structure coiffe avec le queue poly(A) via les facteurs de transcription, augmente l'efficacité de la traduction. De plus, on associe aussi à la structure coiffe un rôle déterminant dans l'épissage de l'ARNm en interagissant directement avec un complexe formé des protéines CBP20 et CBP80. Ce complexe s'avère primordial pour l'assemblage de la machinerie d'épissage et le

transport de l'ARNm du noyau vers de cytoplasme (LEWIS et IZAURRALDE, 1997 ; CALERO *et al.*, 2002).

## 2.2. La structure coiffe chez les virus

La plupart des virus animaux qui se répliquent dans le cytoplasme utilisent des moyens ingénieux pour faire reconnaître leur ARN viral par la machinerie de traduction cellulaire. Certains vont posséder des endonucléases virales pour couper l'ARNm coiffés après 10 à 13 nucléotides et s'en servir comme amorce pour la transcription virale, comme dans le cas du virus de l'influenza (KAWAKAMI *et al.*, 1985). D'autres virus vont avoir une structure IRES à leur extrémité 5' qui sera reconnu par les ribosomes de la cellule comme dans le cas de l'hépatite C (HONDA *et al.*, 1996).

La structure coiffe est une structure spécifique aux cellules eucaryotes. Cependant, certains virus possèdent leur propres enzymes (l'ARN-triphosphatase, la guanylyltransférase et la méthyltransférase) impliquées dans la synthèse de la structure coiffe de l'ARN viral (BISAILLON et LEMAY, 1999). De plus, notons que chez certains organismes les sites responsables de l'activité ARN 5'-triphosphatase, l'ARN guanylyl transférase et de l'ARN (guanine-7) méthyltransférase sont regroupés dans la même et unique protéine, comme dans le cas des virus à ADN qui se répliquent dans le cytoplasme de la cellule hôte (exemple : virus de la vaccine, virus du fibrome de Shope, virus africain de la fièvre porcine) (MAO et SHUMAN, 1994). Cependant, chez les métazoaires (hommes, souris, *Caenorhabditis elegans*), les activités ARN 5'-

triphosphatase et l'ARN guanylyl transférase sont effectuées par la même protéine, alors que l'activité l'ARN (guanine-7) méthyltransférase est supportée par une autre protéine (WANG *et al.*, 1997). En revanche, la synthèse de la structure coiffe chez les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*) se fait par des protéines distinctes qui assurent chacune une seule activité. Cependant ces protéines forment un complexe hétéromérique nécessaire pour la conjonction des activités (MAO *et al.*, 1995 ; TSUKAMOTO *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'étude des protéines impliquées dans la synthèse de la structure coiffe chez certains virus montrent quelques variations. Ainsi, chez les réovirus et les alphavirus les activités l'ARN guanylyl transférase et ARN (guanine-7) méthyltransférase sont assurées par la même protéine qui pourrait interagir avec la protéine responsable de l'activité ARN 5'-triphosphatase (LUONGO *et al.*, 1998 ; VASILJIEVA *et al.*, 2000). Toutefois, des constats ont été portés sur la différence de structure et de mécanisme des protéines impliquées dans l'activité ARN 5'-triphosphatase. La différence de mécanisme se situe au niveau de la nécessité des ions divalents pour assurer l'activité ARN 5'-triphosphatase. De ce fait, les ARN 5'-triphosphatase des levures, de baculovirus, du virus de la vaccine, des réovirus et des alphavirus nécessite la présence des ions divalents, contrairement aux ARN 5'-triphosphatases des métazoaires (HO *et al.*, 1998).

### 3. Hypothèses et objectifs de recherche

#### 3.1 Le virus du Nil occidental

Malgré la grande similitude des génomes du virus du Nil occidental et du virus de l'hépatite C, leur mode de réplication reste néanmoins différent, principalement du fait i) de la présence d'une structure coiffe à l'extrémité 5' du génome du virus du Nil occidental et d'une structure IRES à l'extrémité 5' du génome du virus de l'hépatite C et ii) ces deux virus ne ciblent pas le même type de cellules hôtes.

L'intérêt porté à l'étude de la protéine NS3 du virus du Nil occidental, qui joue un rôle important dans la réplication, vise à développer des inhibiteurs ou des approches ciblées pour pallier la réplication du virus. Une meilleure compréhension de son activité, ainsi que les changements conformationnels que subit la protéine, suite à l'interaction avec ses différents substrats, visent à élucider son mécanisme d'action. De plus, l'inhibition de la fonction ARN-5'-triphosphatase pourrait avoir comme conséquence l'arrêt de la synthèse de la structure coiffe, donc de la traduction de l'ARN en polyprotéine virale. De même, la neutralisation de l'activité ATPase engendrerait un manque d'efficacité de la traduction, de la réplication ainsi que l'encapsidation des virions. Des recherches récentes ont d'ailleurs démontré l'implication de la protéine NS3 dans l'activation de la voie des caspase-8 et -3 dans l'apoptose des cellules infectées (RAMANATHAN *et al.*, 2006 ). Ces constats appuient l'intérêt de concentrer les études sur la protéine NS3 du virus du Nil occidental. De plus, l'homologie de la



protéine NS3 à d'autres protéines virales appartenant à la même famille fait de la protéine NS3 un modèle d'étude pour fournir une meilleure compréhension de ce type de mécanisme, et ceci pourrait nous aider à comprendre le mode catalytique d'autres protéines virales.

Dans la présente étude, notre objectif est de caractériser l'activité ARN-triphosphatase de la protéine NS3 du virus du Nil occidental, vu l'importance de cette activité dans la synthèse de la structure coiffe et dans la réplication du virus dans la cellule hôte. Cette caractérisation portera sur la détermination des conditions optimales ainsi que l'estimation des paramètres cinétiques de l'activité catalytique de la protéine. De plus, nous allons déterminer les interactions de la protéine NS3 avec ses différents substrats d'ARN qui seront analysés en utilisant diverses techniques (la spectroscopie à fluorescence et dichroïsme circulaire). Une étude des changements de conformations potentiels suite à la liaison des différents substrats ainsi que la détermination des propriétés biochimiques et cinétiques permettraient une meilleure compréhension des propriétés de la protéine, son mécanisme catalytique et son rôle exact dans la réplication du virus dans la cellule hôte. De plus, nous essayerons des tests d'inhibitions, mettant en jeu des inhibiteurs qui imiteraient le substrat tels que le tripolyphosphate ou le produit de la réaction qui est le phosphate inorganique. En effet, des tests d'inhibitions de l'activité enzymatique pourrait permettre d'identifier des molécules qui ont un potentiel inhibiteur sur l'activité enzymatique en affectant la synthèse de la structure coiffe de l'ARN viral, et par conséquent la réplication du virus. Ces tests pourraient, éventuellement, aboutir au développement des agents antiviraux.

### 3.2 Le virus de l'hépatite C

Trouver un agent antiviral pour contrecarrer le virus de l'hépatite C relève de l'urgence. Le nombre d'individus atteints augmente et les traitements restent moyennement efficaces. Les recherches effectuées sur la réplication du virus dans les cellules en culture ou avec des systèmes de réplicon qui manquent de cytotoxicité s'avèrent difficiles avec les moyens actuellement disponibles.

Il a été démontré, dans des études antérieures que la protéine NS5B avait une grande affinité aux ions métalliques, ce qui suggère que ces ions sont utilisés dans le mécanisme catalytique de l'enzyme *in vivo*. De plus, le cristal de la protéine en présence d'ions métalliques appuie ce constat (ZHONG *et al.*, 2000). Le mécanisme catalytique de l'enzyme proposé met en jeu l'intervention de deux ions métalliques, en occurrence le  $Mg^{2+}$ . Les ions sont stabilisés par deux acides aspartiques conservés dans le site catalytique de la protéine. Ils sont impliqués dans le repositionnement du substrat dans le site actif et l'activation des réactions nucléophiles impliquées dans la polymérisation des nucléotides (BRESSANELLI *et al.*, 2002).

Dans cette étude, nous nous proposons de démontrer, que mis à part le rôle catalytique des ions métalliques, l'ion  $Mg^{2+}$  pourrait avoir un effet stabilisateur de la structure de la polymérase. Ces ions seraient donc, non seulement impliqués dans le

mécanisme catalytique mais ils pourraient également stabiliser la conformation active de la protéine NS5B, en induisant un changement de conformation.

Pour répondre aux hypothèses qui suggèrent un effet stabilisateur des ions métalliques sur la structure de la polymérase NS5B, nous nous proposons tout d'abord de déterminer les changements de conformation suite à la liaison de la protéine à l'ion  $Mg^{2+}$  en utilisant la spectroscopie à fluorescence en présence de sondes fluorescentes tels que l'ANS (1-anilino-8-naphthalenesulfonate) qui lie les poches hydrophobes. De plus, l'effet stabilisateur de la liaison des ions métalliques pourrait être déterminé par des tests de dénaturation chimiques et thermiques et ce en utilisant la spectroscopie à fluorescence et le dichroïsme circulaire.

## **RÉSULTATS**

Détermination de l'énergie de liaison de l'ARN-triphosphatase du virus du Nil  
occidental à l'ARN

### ARTICLE 1

**Ines Benzaghoul**, Isabelle Bougie, Frédéric Picard-Jean et Martin Bisailon (2006)

Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase.

FEBS Lett. 2006 Feb 6;580(3):867-77

(Voir annexe pour la version publiée)

Département de Biochimie  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, Canada

### **Mon implication dans le travail**

Dans ce projet, j'ai effectué toutes les expériences touchant la caractérisation de l'activité ARN-triphosphatase de la protéine NS3 du virus du Nil occidental et j'ai participé à la rédaction par des commentaires et des suggestions.

L'expression de la protéine et sa purification ainsi que les figures qui se rapportent à la caractérisation enzymatique illustrées dans les articles sont effectuées par moi-même à l'exception de :

- Des tests de dénaturations thermiques par dichroïsme circulaire de la protéine NS3.
- La détermination de la liaison de la protéine NS3 à l'ANS par spectroscopie à fluorescence.
- Modélisation de la structure de la protéine NS3.
- Détermination de la liaison de la protéine à l'ARN par spectroscopie à fluorescence et par dichroïsme circulaire.

**Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase****Ines Benzaghoul<sup>†</sup>, Isabelle Bougie<sup>†</sup>, Frédéric Picard-Jean<sup>†</sup> and Martin Bisaillon\****Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada***\* Corresponding author:**

Martin Bisaillon, Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, 3001 12e avenue, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4, Tel: (819) 564-5227, Fax: (819) 564-5340, E-mail: Martin.Bisaillon@USherbrooke.ca

**<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work****Abstract**

The West Nile virus (WNV) RNA genome harbors the characteristic methylated cap structure present at the 5' end of eukaryotic mRNAs. In the present study, we report a detailed study of the binding energetics and thermodynamic parameters involved in the interaction between RNA and the WNV RNA triphosphatase, an enzyme involved in the synthesis of the RNA cap structure. Fluorescence spectroscopy assays revealed that the initial interaction between RNA and the enzyme is characterized by a high enthalpy of association, and that the minimal RNA binding site of NS3 is 13 nucleotides. In order to provide insight into the relationship between the enzyme structure and RNA binding, we also correlated the effect of RNA binding on protein structure using both circular dichroism and denaturation studies as structural indicators. Our data indicate that the protein undergoes structural modifications upon RNA binding, although the interaction does not significantly modify the stability of the protein.

*Keywords:* RNA triphosphatase, West Nile virus, RNA binding, Thermodynamics,  
Fluorescence spectroscopy

## 1. Introduction

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne virus that primarily infects birds but occasionally also infects humans and horses [1, 2]. In humans, the most serious manifestation of WNV infection is a fatal inflammation of the brain [3]. The frequency of WNV outbreaks in humans has increased in recent years, and the geographical distribution of WNV has expanded to the Western hemisphere in 1999 [4]. Since then, the virus has spread rapidly throughout North America and has recently reached the European continent [5]. The lack of vaccines or therapeutic treatments for WNV infections has therefore prompted the elaboration of extensive prevention strategies.

WNV is a member of the *Flaviviridae* family which includes more than 70 human pathogens such as hepatitis C, yellow fever, and Dengue fever viruses [6]. The flaviviral genome is a single-stranded RNA of positive polarity containing a single open reading frame of about 11 kb in length [7, 8]. This RNA encodes for a large polyprotein precursor that is further processed into three structural and seven nonstructural proteins [9, 10]. The nonstructural protein 3, NS3, is a multifunctional protein that displays several distinct enzymatic functions. The N-terminal domain of the protein harbors a serine protease activity which is involved in the proteolytic cleavage of the viral polyprotein precursor [11]. The C-terminal domain of NS3 has been shown to possess both nucleoside triphosphatase (NTPase) and helicase activities [12]. Finally, an RNA triphosphatase activity has previously been reported for a 50 kDa C-terminal region of the WNV NS3 protein released with subtilisin from the membranes of infected cells [13].

The WNV RNA genome harbors the characteristic methylated cap structure present at the 5' end of eukaryotic mRNAs [14]. This structure,  $m^7GpppN-$ , has been



shown to play critical roles both in translation and mRNA stability [15, 16]. The RNA cap structure is formed co-transcriptionally by three sequential enzymatic reactions catalyzed by an RNA 5' triphosphatase, an RNA guanylyltransferase, and an RNA (guanine-N7)methyltransferase. The importance of the cap structure for RNA metabolism is underscored by genetic analyses in *Saccharomyces cerevisiae* where it has been shown that the triphosphatase, guanylyltransferase and methyltransferase components of the capping apparatus are essential for cell viability [17-22].

Although the RNA cap structures originating from viral and cellular enzymes are often identical, the physical organization of the genes, subunit composition, structure, and catalytic mechanisms of the known virus-encoded mRNA capping enzymes are significantly different from those of metazoan host cells [16]. Of particular interest is the RNA triphosphatase component of the capping apparatus, which is both structurally and mechanistically different in mammalian cells. As a consequence these viral cap-forming enzymes, such as the WNV NS3 protein, are attractive targets for antiviral drugs that would interfere with the capping of pathogen mRNAs while leaving the host capping enzymes unaffected. Two distinct families of RNA triphosphatases have been clearly established so far. The first family includes enzymes from metazoan and plants which belong to the cysteine phosphatases superfamily. These proteins contain a characteristic HCXXXXXR(S/T) motif, and act via the formation of a covalent enzyme-(cysteinyI-S)-phosphate intermediate [22, 23]. Their enzymatic activity is independent from divalent cations. Moreover, crystal structure analyses suggest that they share a phosphate binding loop and a core tertiary structure with other cysteine phosphatases [24]. The second family comprises RNA triphosphatases from DNA viruses, fungus, and protozoan [22, 25-28]. These enzymes require divalent cations for their enzymatic activity and share characteristic conserved

elements. Furthermore, they also possess the ability to hydrolyze NTPs. Crystal structure analyses of the yeast RNA triphosphatase have revealed a unique active site architecture in which an eight-stranded  $\beta$ -barrel forms a topologically closed tunnel [29]. Interestingly, RNA triphosphatases from RNA viruses belonging to the *Alphaviridae*, *Reoviridae*, and *Flaviviridae* families appear to lack any resemblance to enzymes from the two classical RNA triphosphatase families [13, 30-33]. It is thought that the active site of the RNA triphosphatases from RNA viruses might share elements with the helicase/NTPase catalytic center.

As a first step towards elucidating the nature of the specific interaction between RNA and the WNV RNA triphosphatase, we have utilized fluorescence spectroscopy to precisely monitor the energetics of RNA binding to the enzyme. We report a detailed study of the binding kinetics and thermodynamic parameters involved in the interaction between RNA and the NS3 protein. Using circular dichroism, we also investigated the effect of RNA binding on both the structure and stability of the protein. Finally, we developed a three-dimensional model of the WNV NS3 protein based on the crystal structure of related proteins from other flaviviruses. We believe that such quantitative analyses, and provide crucial insights on the interaction between RNA and RNA triphosphatases.

## 2. Materials and methods

### 2.1 cDNA synthesis and cloning

A cDNA fragment covering the C-terminal region of the WNV (strain NY99) NS3 gene was synthesized from genomic WNV RNA (a generous gift of Dr. Hugues Charest) through reverse-transcription (RT)-PCR according to the manufacturer's instructions (Qiagen) using the primers 5'-GGCTCATACATAAGCGCGATACATATGGGTGAAAGGATG GATGAGCCA-3' and 5'-CAGAACCTCAATGAGCCCGGATCCTTAACGTTTTCCCG AGGCGAAGTC-3'. These primers were used to generate an *Nde*I site and a *Bam*HI site flanking the 3' region of the WNV NS3 gene. The generated cDNA corresponds to the 5486-6495 nucleotide region segment of the WNV genome strain NY99.

### 2.2 Expression and purification of the recombinant NS3 protein

A plasmid for the expression of a truncated WNV NS3 protein was generated by inserting a truncated version of the WNV NS3 gene, encompassing amino acid residues 168 to 618, between the *Nde*I and *Bam*HI cloning sites of the pET28a expression plasmid (Novagen). In this context, the truncated NS3 protein is fused in frame with an N-terminal peptide containing 6 tandem histidine residues, and expression of the His-tagged protein is driven by a T7 RNA polymerase promoter. The resulting recombinant plasmid (pET-NS3Δ167) was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and a 1000-ml culture of *E. coli* BL21(DE3)/pET-NS3Δ166 was grown at 37°C in Luria-Bertani medium containing 30 µg/ml of kanamycin until the  $A_{600}$  reached 0.5. The culture was adjusted to 0.4 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and the incubation continued at 18°C for 20 h in the presence of 2% ethanol.

The cells were then harvested by centrifugation, and the pellet stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All subsequent procedures were performed at  $4^{\circ}\text{C}$ . Thawed bacteria pellets were resuspended in 5 ml of lysis buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 10% sucrose) and cell lysis achieved by the addition of lysozyme and Triton X-100 to final concentrations of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 0.1%, respectively. The lysates were sonicated to reduce viscosity, and any insoluble material removed by centrifugation at 13,000 rpm for 45 min. The soluble extract was applied to a 3-ml column of Ni-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen) that had been equilibrated with buffer A containing 0.1% Triton X-100. The column was washed with buffer A containing 5 mM imidazole, and then eluted stepwise with buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, and 10% glycerol) containing 50, 100, 200, 500, and 1000 mM imidazole. The polypeptide composition of the column fractions was monitored by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The recombinant NS3 protein was retained on the column and recovered predominantly in the 200 mM imidazole eluate. The eluate was applied to a 3-ml column of phosphocellulose that had been equilibrated in buffer C (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, and 10% glycerol). The column was washed with the same buffer, and then eluted stepwise with buffer C containing 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 1.0 M NaCl. The recombinant protein was retained on the column and was recovered in both the 0.5 M and 1.0M NaCl fractions. Following dialysis against buffer C, the phosphocellulose preparation was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein concentration was determined by the Bradford dye binding method using bovine serum albumin as the standard.

### *2.3 Preparation of the RNA triphosphatase substrate*

An RNA substrate of 84 nucleotides was synthesized with the MAXIscript kit (Ambion) using T7 RNA polymerase and [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP. The RNA transcript was synthesized from the pBS-KSII+ plasmid (Stratagene) that had been linearized with *Hind*III. The RNA substrate was purified on a denaturing 10% polyacrylamide gel and visualized by ultraviolet shadowing. The corresponding band was excised, and then eluted from the gel by an overnight incubation in 0.1% SDS/0.5 M ammonium acetate. The RNA was then precipitated with ethanol and quantitated by spectrophotometry.

### *2.4 RNA triphosphatase assay*

Reaction mixtures (20  $\mu\text{l}$ ) containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM DTT, 0.9  $\mu\text{M}$  of the RNA substrate radiolabeled at its terminal  $\gamma$ -phosphate, and various concentrations of enzyme (as indicated) were incubated for 60 min at 37 °C. The reactions were quenched by adding 2  $\mu\text{l}$  of 5 M formic acid. Aliquots of the mixtures were applied to a polyethyleneimine-cellulose TLC plate, which was developed with 0.75 M potassium phosphate, pH 4.3. The release of  $^{32}\text{Pi}$  was quantitated by scanning the TLC plate with a phosphorimager.

### *2.5 Synthetic RNAs*

RNA molecules of various lengths were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa). The 5' hydroxy-terminated RNAs were quantified by spectrophotometry at 260 nm.

## 2.6 Fluorescence measurements

Fluorescence was measured using an Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer. Excitation was performed at a wavelength of 290 nm. Background emission was eliminated by subtracting the signal from either buffer alone or buffer containing the appropriate quantity of substrate.

The extent to which RNA binds to the WNV NS3 protein was determined by monitoring the fluorescence emission of a fixed concentration of proteins and titrating with a given ligand. The binding can be described by Equation 1,

$$K_d = \frac{[\text{NS3}][\text{RNA}]}{[\text{NS3} \cdot \text{RNA}]} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $K_d$  is the apparent dissociation constant,  $[\text{NS3}]$  is the concentration of the protein,  $[\text{NS3} \cdot \text{RNA}]$  is the concentration of complexed protein, and  $[\text{RNA}]$  is the concentration of unbound RNA.

The proportion of RNA-bound protein as described by Equation 1 is related to measured fluorescence emission intensity by Equation 2,

$$\Delta F / \Delta F_{\max} = [\text{NS3} \cdot \text{RNA}] / [\text{NS3}]_{\text{tot}} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $\Delta F$  is the magnitude of the difference between the observed fluorescence intensity at a given concentration of RNA and the fluorescence intensity in the absence of RNA,  $\Delta F_{\max}$  is the difference at infinite  $[\text{RNA}]$ , and  $[\text{NS3}]_{\text{tot}}$  is the total protein concentration.

If the total RNA concentration,  $[\text{RNA}]_{\text{tot}}$ , is in large molar excess relative to  $[\text{NS3}]_{\text{tot}}$ , then it can be assumed that  $[\text{RNA}]$  is approximately equal to  $[\text{RNA}]_{\text{tot}}$ . Equations 1 and 2 can then be combined to give Equation 3,

$$\Delta F / \Delta F_{\text{max}} = [\text{RNA}]_{\text{tot}} / (K_d + [\text{RNA}]_{\text{tot}}) \quad (\text{Eq. 3})$$

The  $K_d$  values were determined from a nonlinear least square regression analysis of titration data by using Equation 3.

## 2.7 Electrophoretic mobility shift assays

An electrophoretic mobility shift assay was used to measure the binding of the WNV NS3 protein to RNA. A radiolabeled RNA substrate of 84 nucleotides was synthesized by *in vitro* transcription using the T7 RNA polymerase (New England Bio-labs) in the presence of  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ . The RNA transcript was synthesized from the pBS-KSII+ plasmid (Stratagene), which had been linearized with *HindIII*. The RNA substrate was purified on a denaturing 10% polyacrylamide gel and visualized by UV shadowing. The corresponding band was excised and then eluted from the gel by an overnight incubation in 0.1% SDS/0.5 M ammonium acetate. The RNA was then precipitated with ethanol and quantified by spectrophotometry.

The standard binding reaction was performed in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, and incubated for 30 min at 25 °C. The binding reaction mixtures were directly subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels, and the bands were visualized by autoradiography. The extent of binding was quantitated by scanning the gel with a PhosphorImager (Amersham Biosciences). The apparent dissociation constant ( $K_d$ ) for RNA was determined according to Equation 4,

$$f_D = \frac{[NS3]}{K_d + [NS3]} \quad (\text{Eq. 4})$$

Where  $f_D$  represents the fraction of the shifted nucleic acids,  $[NS3]$  is the total protein concentration, and  $K_d$  is the dissociation constant for the binding reaction.

### 2.8 Circular dichroism spectroscopy measurements

Circular dichroism (CD) measurements were performed with a Jasco J-810 spectropolarimeter. The samples were analyzed in quartz cells with pathlengths of 1 mm. Far-UV and near-UV wavelength scans were recorded from 200 to 250 nm and from 250 to 340 nm, respectively. All the CD spectra were corrected by subtraction of the background for the spectrum obtained with either buffer alone or buffer containing the ligand. The average of 3 wavelength scans is presented. The ellipticity results were expressed as mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , in degrees·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>.

### 2.9 Thermal unfolding experiments

Thermal denaturations were monitored by following the change in CD ellipticity of the NS3 protein (5 μM) at 222 nm. The samples were heated from 5 °C to 110 °C, at a heating rate of 1 °C/min. The ellipticity results were expressed as mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , in degrees·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>. The fraction of unfolded protein at each temperature was determined by calculating the ratio  $[\theta_{222}]/[\theta_{222}]_d$ , where  $[\theta_{222}]_d$  is the molar ellipticity for the completely unfolded enzyme.



### *2.10 ANS binding measurements*

Binding of ANS (1-anilino-8-naphtalenesulfonate) was evaluated by measuring the fluorescence enhancement of ANS (50  $\mu$ M) upon excitation at a wavelength of 380 nm. The emission spectra were integrated from 400 to 600 nm.

### *2.11 Homology modeling*

The crystal structure of the Hepatitis C virus NS3 protein was used as a template to model the WNV NS3 protein. The atomic coordinates were obtained from the Protein Data Bank file 1A1V, representing the crystal structure of the complex between the HCV NS3 protein and a synthetic oligonucleotide. The predicted three-dimensional structure of the WNV NS3 enzyme active site was generated with the Deep View program [34].

### 3. Results

#### *3.1 Expression and purification of the WNV NS3 protein*

A cDNA encoding a truncated WNV version of the NS3 protein lacking the N-terminal protease domain (amino acids 1-166) was cloned into a T7 RNA polymerase-based vector that allowed the addition of a 6-histidine tag. In order to characterize the RNA triphosphatase activity of the enzyme, the protein was expressed in bacteria and purified by sequential nickel-agarose and phosphocellulose chromatography steps. SDS-PAGE analysis revealed that the 53-kDa NS3 protein (amino acids 167-618) was the predominant polypeptide in the purified fraction (Fig. 1a). The concentration of NS3 protein in this fraction was estimated to be 11  $\mu$ M. The enzymatic characterization of the recombinant NS3 protein was performed using this phosphocellulose fraction.

#### *3.2 Characterization of the RNA triphosphatase activity*

To directly assess if the recombinant WNV NS3 protein can act as an RNA triphosphatase, an RNA substrate labeled at its terminal  $\gamma$ -phosphate was prepared by *in vitro* transcription in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP. The RNA triphosphatase activity of the NS3 protein was then gauged by the release of  $^{32}$ Pi from the radiolabeled-RNA. The extent of phosphate hydrolysis during a 60 min incubation at 37°C was proportional to input protein (Fig. 1b). An apparent  $K_m$  value of 3  $\mu$ M was determined by a double-reciprocal plot for the RNA substrate (Fig. 1c).

In order to gain additional insight into the NS3-associated RNA 5'-triphosphatase activity, the reaction requirements, optima, and kinetic parameters were

investigated. To determine the divalent cation cofactor requirements of the enzymatic activity, assays were performed in the presence of various  $\text{MgCl}_2$  concentrations. The NS3 protein exhibited its maximum RNA triphosphatase activity in the absence of magnesium (Fig. 1d). Addition of magnesium ions resulted in a concentration-dependent decrease of the phosphohydrolase activity. The presence of 15 mM  $\text{MgCl}_2$  resulted in a 50% inhibition of the NS3-mediated RNA triphosphatase activity (Fig. 1d). Interestingly, the addition of manganese also resulted in a decrease of the RNA triphosphatase activity. The activity was inhibited by 50% in the presence of 1 mM  $\text{MnCl}_2$  (Fig. 1d). The presence of high concentrations of both cobalt and calcium ions did not have any effect on the NS3-mediated RNA triphosphatase activity (data not shown). It should be noted that the magnesium- and manganese-induced inhibition are not related to an increase of the ionic strength of the reaction buffer as revealed from the assays performed in the presence of increasing concentrations of KCl (Fig. 1e). RNA triphosphatase assays performed in the presence of 15 mM KCl only resulted in an inhibition of 20%.

The effect of temperature on the RNA 5-triphosphatase was also analyzed. The temperature optimum of the reaction, as judged by the maximum rate of triphosphate-terminated RNA hydrolysis, was 37 °C (Fig. 1f). Reactions that were incubated at 30 or 50 °C resulted in a decrease of nearly 50% of hydrolysis. Finally, the pH-dependence of the RNA triphosphatase reaction was analyzed (Fig. 1g). The hydrolysis of the radiolabeled-RNA was shown to cover a wide pH-range from 6.0 to 9.0, with a pH optimum for the reaction at 7.0.

Because of its importance in the WNV replication cycle, the NS3 protein represents an attractive target for the design and development of small molecules inhibitors. Given that inorganic phosphate is the product of the RNA triphosphatase

reaction, we surmised that phosphate derivatives might be efficient competitors and therefore served as the starting lead molecules for our inhibition studies. The addition of high concentrations of inorganic phosphate did not lead to a decrease of the NS3-mediated phosphohydrolase reaction (Fig. 1h). However, inorganic tripolyphosphate ( $\text{PPP}_i$ ) was a very potent inhibitor, with 50% inhibition occurring at  $0.7 \mu\text{M}$   $\text{PPP}_i$  (Fig. 1h). The  $K_i$  for this inhibition was calculated from the Cheng-Prusoff equation [35] to be approximately 40 nM (data not shown).

### 3.3 Fluorescence properties of NS3

The binding of nucleic acids to free enzymes has previously been shown to result in a significant decrease in emission fluorescence intensities [36, 37]. We initially sought to investigate the binding of RNA to the WNV RNA triphosphatase by titrating the binding of RNA to a fixed concentration of the NS3 protein. The fluorescence emission spectrum of the purified NS3 protein in standard buffer at  $22^\circ\text{C}$  is shown in figure 2a. In order to obtain the maximal emission peak at the low concentrations of protein required to accurately determine  $K_d$  values, excitation was carried out at 290 nm. Both tyrosine and tryptophan absorb at this wavelength [38]. However, varying the excitation wavelength from 254 nm, where the contribution of tyrosine fluorescence to the emission spectrum would be the greatest, to 290 nm, where the emission spectrum would arise almost exclusively from tryptophan, produced no change in the position of  $\lambda_{\text{max}}$  (338 nm) or in the spectral bandwidth (60 nm at half-height) (data not shown). Thus, despite the fact that NS3 contains 11 tyrosines in addition to the 5 tryptophans, the emission spectrum is dominated by the indole fluorophores. This dominance is due, in part, to the higher extinction coefficient of tryptophan, and to resonance energy transfer from tyrosine to tryptophan. The

emission maximum of the enzyme (338 nm) is blue-shifted relative to that of free L-tryptophan, which under the same conditions is observed to be at 350 nm. The  $\lambda_{\text{max}}$  of tryptophan is highly sensitive to the polarity of the microenvironment in which its indole sidechain is located. Blue shifts of protein emission spectra have been ascribed to shielding of the tryptophan residues from the aqueous phase [39]. This shielding is the result of the protein's three-dimensional structure. Accordingly, denaturation of NS3 with 8M urea results in a red shift of  $\lambda_{\text{max}}$  towards 350 nm (Fig. 2a).

The molar intensity of the fluorescence emission spectrum of the WNV RNA triphosphatase was also evaluated. This spectrum was determined in order to see if significant protein aggregation, or if the loss of protein from solution through adhesion, could influence the data. As can be seen in figure 2b, a decrease in fluorescence is observed with increasing concentrations of NS3. A linear change of 3.6 fluorescence intensity units/nM of protein was observed over the range examined. This relatively small change can be attributed to minor aggregation occurring at higher protein concentrations. Therefore, all the binding experiments were subsequently performed at a protein concentration of 1  $\mu\text{M}$ , with the assumption that the binding equilibrium was not complicated by the presence of an aggregation equilibrium.

### *3.4 RNA binding activity of NS3*

Typical emission spectra obtained from the addition of RNA to the NS3 protein are shown in figure 2c. We observed that the binding of a 30-nt-long RNA substrate to the enzyme resulted in a modification of the intensity of the intrinsic fluorescence of the protein. The addition of increasing amounts of the RNA substrate produced a decrease in the fluorescence intensity, however both the emission maximum and spectral bandwidth were not significantly affected. The corresponding saturation

isotherm, generated by plotting the change in fluorescence intensity at 338 nm as a function of added RNA, is shown in figure 2d. Quenching saturated at micromolar RNA concentrations, and a 6  $\mu\text{M}$   $K_d$  value could be estimated for the RNA substrate from a fit of Equation 1 to the generated saturation isotherm. It should be noted that a similar binding constant was obtained using an electrophoretic mobility shift assay with a triphosphate-terminated radiolabeled RNA transcript of 84 nucleotides (data not shown) thereby demonstrating that the nature of the 5' end of the RNA substrate (hydroxy- or triphosphate-terminated) does not influence the RNA binding ability of the protein.

About 37 % of the intrinsic protein fluorescence was accessible to the quencher RNA substrate (Fig. 2d). As a consequence we were able to evaluate the Gibbs free energy of binding ( $\Delta G$ ), as well as both the enthalpy ( $\Delta H$ ) and the entropy changes ( $\Delta S$ ) associated with the binding of RNA to the enzyme. Evaluation of these thermodynamic parameters yields important insight into the nature of the RNA binding reaction. Our binding studies indicate that the Gibbs free energy of binding for the interaction of RNA with the enzyme was -29.8 kJ/mol. Although the free energy of binding provides the overall description of the system, defining the entropic and enthalpic contributions to the free energy provides a more complete understanding of the forces that drive the protein-RNA association. The enthalpic and entropic contributions to the free energy of binding were determined by measuring the initial binding of RNA to the enzyme as a function of temperature (Fig. 3a). The RNA binding reaction was shown to be exothermic at 25°C with a high enthalpy of association,  $\Delta H = -20.6$  kJ/mol. Analysis of a van't Hoff plot for the interaction between RNA and the WNV RNA triphosphatase (Fig. 3a) revealed that the  $T\Delta S$  value for the binding reaction was 9.2 kJ/mol, clearly indicating that the initial RNA binding

step is primarily driven by enthalpy. Furthermore, the binding reaction is clearly favourable with the resultant  $\Delta S^\circ = 30 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ .

An important component of protein-ligand binding energetics is the interaction of protein residues with the electrostatic field of the ligand. The salt-dependence of the NS3-RNA interaction provides information about the contribution of electrostatic interactions. The contribution of specific electrostatic interactions to the binding of RNA to the NS3 protein was investigated by monitoring the salt-dependence of the binding process. The experimentally observed equilibrium constant was clearly dependent on the ionic strength of the solution (Fig. 3b). In solution, nucleic acids are associated with a layer of positive counterions, which neutralizes the high negative charge of the phosphodiester backbone [40]. These counterions can be displaced by electrostatic interactions with positively charged groups of the protein, leading to a dependence of the binding reaction on salt concentration. As shown in figure 3b, the RNA-enzyme interaction was attenuated at elevated KCl concentrations. The equilibrium binding experiments showed that the apparent  $K_d$  at 500 mM KCl was 40  $\mu\text{M}$ , almost seven times higher than in absence of KCl. Evaluation of the Gibbs energy due to electrostatic interactions ( $\Delta\Delta G_{\text{ES}}$ ) by extrapolation of the binding reaction to an ionic strength of 1M, the standard state where electrostatic interactions are effectively eliminated, revealed that 20.4 % of the binding energy is derived from electrostatic interactions.

The use of fluorescence spectroscopy also allowed us to monitor the kinetics of the initial RNA binding to the WNV NS3 protein (Fig. 3c). The progress of the binding reaction was followed for 60 seconds upon addition of saturating amounts of RNA. The results show that there is a rapid exponential decrease in fluorescence intensity following the addition of RNA. An apparent association rate of  $47 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$

was estimated from the data. Half-maximal quenching was observed at approximately 9 sec, while maximal quenching was achieved after 300 sec of incubation with RNA and remained constant thereafter. The exponential decrease in fluorescence observed following the addition of RNA was not due to photobleaching, as similar results were obtained when the protein was incubated away from the light source.

Finally, in order to determine the minimal RNA binding site size, fluorescence spectroscopy assays were performed with RNA substrates ranging from 10 to 30 nt (Fig. 3d). Our data indicate that the enzyme could bind efficiently to RNA substrates of 20, 15, and 13 nt in length ( $K_d$  values of 6, 5, and 4  $\mu$ M, respectively). However, RNA substrates of 11 or 12 nt were bound very weakly by the enzyme, and no accurate binding constants could be efficiently and repeatedly determined. No binding could be observed for RNA substrates of 10 nt or less. Based on these data, we conclude that the minimal RNA binding site size of NS3 is 13 nt. It should also be noted that the addition of various concentrations of metal ions ( $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$ ) did not affect the RNA binding properties of the NS3 protein. Similar binding parameters ( $K_d$ , minimal binding site, association rate, enthalpic and entropic contributions) were determined when experiments were performed in the presence of increasing concentrations of metal ions up to 50 mM.

### *3.5 Effect of RNA binding on the structure of NS3*

Far-UV circular dichroism (CD) spectra can provide useful information on the secondary structural features of a protein while the CD spectra in the near-UV region reflect the environments of the aromatic amino acid side chains, giving information about the tertiary structure of a protein. In an effort to determine if the binding of RNA



to the NS3 protein results in the modification of the NS3 structure, far- and near-UV CD spectra were recorded both in the presence and the absence of RNA. Analysis of the far-UV spectrum of unliganded NS3 suggests that the secondary structure of the protein contains 37%  $\alpha$ -helix and 26%  $\beta$ -sheet (Fig. 4a) [41]. Examination of the far-UV CD spectrum of the NS3-RNA complex revealed that the binding of RNA to the protein does not induce a significant modification of the secondary structure of the protein (data not shown). Thus, the far-UV CD spectra suggest that the NS3 protein maintains a comparably ordered secondary structure following the binding of RNA.

Analysis of the near-UV CD spectra of the NS3 protein in both the absence and presence of RNA was performed from 250 to 300 nm. A significantly increased molar ellipticity is observed over the 265-280 nm region when the protein is incubated with RNA (Fig. 4b). Furthermore, the NS3-RNA complex displays negative ellipticity in the 280-320 nm region in comparison to ellipticity observed for the unliganded NS3 protein. These dramatic changes in the near-UV CD spectra clearly indicate that a conformational change occurs in the tertiary structure of NS3 upon RNA binding. Overall, the CD spectra suggest that the protein undergoes conformational change upon the binding of RNA, although no radical modifications of the overall protein architecture are occurring.

In order to gain additional insights into the structural modifications that occur upon RNA binding, we investigated the binding of a structural fluorescent reporter to the enzyme. The exposure of the hydrophobic area of the NS3 protein was evaluated by measuring the binding of ANS (1-anilino-8-naphtalenesulfonate) to the protein. ANS is a reporter of exposed hydrophobic surfaces on proteins that binds with high affinity to hydrophobic patches, which results in an enhancement of ANS intrinsic fluorescence [42]. Our data revealed that the unliganded NS3 protein binds very

weakly to ANS, probably reflecting limited hydrophobic regions at the surface of the protein (Fig. 5). No significant modification of the ANS fluorescence is observed when the protein is incubated in the presence of saturating concentrations of RNA (Fig. 5). Overall, these data indicate that the conformational change that is observed upon RNA binding does not involve significant hydrophobic exposure on the NS3 surface.

### *3.6 Effect of RNA binding on the stability of NS3*

Circular dichroism spectroscopy assays were performed to investigate whether or not the binding of RNA could increase the stability of the WNV NS3 protein. Thermal denaturation assays were carried out from 4 °C to 110 °C both in the presence and absence of RNA. As shown in figures 6a and 6b, the helical content (222 nm) of the enzyme is decreased upon thermal denaturation both for the unliganded protein and the protein bound to RNA. Unfolding of the enzyme was therefore evaluated by monitoring the changes in the  $\alpha$ -helix content of the protein (222 nm). The denaturation assays performed with the unliganded NS3 protein revealed a monophasic unfolding curve, suggestive of a two-state unfolding model. No intermediate form could be detected during the unfolding process, and a midpoint of thermal transition ( $T_m$ ) of 43.68 °C (Fig. 6C) was determined. Addition of saturating concentrations of RNA only resulted in a small shift of the  $T_m$  value to 44.34 °C. Accordingly, evaluation of the thermodynamic parameters of unfolding revealed similar values for the unliganded NS3 protein or the protein bound to RNA (Table 1). Overall, these results demonstrate that the binding of RNA to the NS3 protein does not significantly increase the structural stability of the enzyme.

## 4. Discussion

Analyses of protein-ligand interactions are a necessary counterpart to high resolution structural studies for full comprehension of enzymatic reactions in a quantitative way. In the present study, the use of fluorescence spectroscopy and circular dichroism allowed us to determine both the thermodynamic parameters and conformational changes that are associated with the binding of RNA to the WNV NS3 protein. While the thermodynamic parameters of the binding reaction do not provide a complete picture of the binding activity, they can suggest which features are likely to be important for the interaction, and provide a framework to construct an accurate model of the complex.

Defining the interaction between the enzymes involved in RNA capping and their ligands is critical to any understanding of the role of these proteins. A key question at this point is how do proteins involved in RNA capping bind to their RNA substrates? The fluorescence data reported in this study provide a surprisingly simple picture of RNA binding to the WNV RNA triphosphatase. All of the kinetic processes measured in this work were adequately analyzed using single exponential rate equations. In no case was there any evidence for another significant kinetic barrier during binding that would require the use of a second exponential equation to satisfactorily fit the data. In evaluating the energetics of RNA binding, our study leads to an increased understanding of the molecular basis of substrate recognition by the WNV RNA triphosphatase. Changes in both the magnitude and the sign of  $\Delta H$  and  $\Delta S$ , in conjunction with structural data, can provide crucial information about the structural alterations that accompany ligand binding in terms of 1) changes in solvation state; 2) interactions between ligand and protein, such as electrostatic and hydrophobic

interactions; and 3) changes in conformation/dynamics induced by ligand binding. Our thermodynamic analyses indicate that the initial association of RNA with the NS3 protein is driven by a favorable enthalpy change. Favorable negative enthalpy changes are generally associated with contributions from hydrogen bonds, van der Waal's interactions, or ionic interactions [43]. The importance of electrostatic interactions for the binding of RNA to the NS3 protein was further noted in our fluorescence spectroscopy. The observed reduction in RNA binding in the presence of salt is also a likely cause for the reduction of the RNA triphosphatase activity that is noted at high salt concentrations. This mode of RNA binding by the NS3 protein (favorable enthalpic effect) is quite different than the one recently determined for the yeast RNA guanylyltransferase, the only other enzyme involved in RNA capping for which the thermodynamic parameters of the RNA binding reaction have been evaluated [36]. The studies performed with the yeast guanylyltransferase clearly indicated that the RNA binding reaction is dominated by a favorable entropic effect, with a minor contribution from a favorable enthalpy change [36]. These results suggested that hydrophobic and stacking interactions play a more significant role in the formation of the yeast guanylyltransferase-RNA complex compared with ionic contacts.

Our studies allowed us to determine key aspects involved in the interaction between the WNV RNA triphosphatase and RNA. The multifunctional vaccinia virus capping enzyme is the only viral enzyme involved in RNA capping for which RNA binding studies have previously been performed [44]. This protein harbors the catalytic sites for all three enzymatic reactions involved in the capping of vaccinia virus mRNAs (RNA triphosphatase, RNA guanylyltransferase, and RNA (guanine-7) methyltransferase). Using electrophoretic mobility shift assays it was estimated that the minimal RNA binding site of the vaccinia enzyme was 20-25 nucleotides, and that

no particular 5' end structure was required for binding [44]. As demonstrated in our binding assays, this last property is also shared by the WNV RNA triphosphatase. Using fluorescence spectroscopy, we demonstrated that the minimal RNA binding site size of the NS3 protein is 13 nt. One of the novel aspects of our binding studies is the analysis of the conformational changes that occur following the interaction of NS3 with RNA. Conformational changes in proteins are frequently critical for their function and/or regulation. We have looked for conformational changes in NS3 upon the binding of RNA using spectroscopic approaches. Our data indicate that a conformational change is occurring upon binding of the RNA to the NS3 architecture. This is in contrast to the yeast RNA triphosphatase enzyme which possesses a preformed active site, and where major domain rearrangements are not needed to form a catalytically active site [45]. Additional differences between the two enzymes include the metal ion requirements and the three-dimensional structure of the proteins. In contrast to the WNV NS3 protein, the yeast RNA triphosphatase, has been shown to require divalent cations for its activity, and the active site of the enzyme is located in a tunnel-like structure composed of eight antiparallel  $\beta$  strands [22, 29].

The RNA triphosphatase component of the WNV capping is an attractive target for the development of antiviral drugs that would selectively interfere with the capping of the viral mRNAs while leaving the host capping enzymes unaffected. This suggestion is based on the fact that the catalytic mechanism and structure of the WNV RNA triphosphatase is completely different from the human enzyme. Given that inorganic phosphate is the product of the RNA triphosphatase reaction, we surmised that phosphate derivatives might be efficient competitors. Interestingly, the use of product-derived inhibitors has recently been shown to be efficient for the design of both HCV and WNV protease inhibitors [46, 47]. Using such an approach we

demonstrated that tripolyphosphate is a very potent inhibitor of the WNV RNA triphosphatase activity. This inhibitor binds more tightly to the enzyme active site than the triphosphate-terminated RNA substrate. Tripolyphosphate, with its ability to interact with the WNV RNA triphosphatase, has the potential to serve as a template for the development of more potent inhibitors. Interestingly, tripolyphosphate has previously been shown to inhibit the RNA triphosphatase activity from *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma brucei*, and *Chlorella* virus [48-50]. Analysis of the WNV NS3 protein structure using computer algorithms reveals that both the Hepatitis C virus and WNV NS3 protein adopt very similar conformations (Fig. 7). The high level of similarity between the NS3 protein of different members of the *Flaviviridae* family [8] suggests that tripolyphosphate might display broad spectrum inhibitory activity against the other members of the family. Future analysis of the interaction between RNA triphosphatase inhibitors and the enzyme will also undoubtedly shed light on the chemistry of the RNA capping reaction.

The crystal structure coordinates of the hepatitis C virus NS3 protein [51] were used to generate a homology model of the WNV NS3 protein. Analysis of the predicted structural features revealed significant overall structural similarities between the two enzymes (Fig. 7). Interestingly, the RNA triphosphatase of flaviviruses appears to belong to a new family of RNA triphosphatases that use the active center of a classical helicase to mediate their RNA triphosphatase activity. The hypothesis of one active center shared by NTPase/helicase and RNA triphosphatase is not novel for RNA viruses. A recombinant  $\lambda 1$  protein from reovirus was previously shown to possess both NTPase/helicase and RNA triphosphatase activities [31]. Competitive binding experiments revealed that both activities occur at a common active site [31]. The replicase protein of the bamboo mosaic virus (*Alphaviridae*) also displays both

NTPase/helicase and RNA triphosphatase [52]. More recently, a recombinant NS3 protein from Dengue virus, a member of the *Flaviviridae* family, was also shown to harbor both these activities [33]. Elegant mutational studies performed both with the bamboo mosaic and Dengue viruses also confirmed that the RNA triphosphatase reaction requires an intact NTPase/helicase activity [33, 52]. We believe that the design of the WNV NS3 protein model has important implications for the design of drugs and small molecule inhibitors of potential therapeutic value. The high level of similarity between the WNV NS3 protein [8] and the corresponding protein of other flaviviruses suggest that the model may be broadly applicable to the other members of the family.

The metal ion requirements for the RNA triphosphatase activity mediated by the NS3 protein of flaviviruses has been the subject of intense debate during the past few years. The activity has been shown to be independent of magnesium ions for both the full-length recombinant NS3 protein of Dengue virus and the 50 kDa C-terminal region of the WNV NS3 protein released with subtilisin from the membranes of infected cells [13, 32]. Our assays also indicate that the RNA triphosphatase activity of the recombinant WNV NS3 protein is magnesium-independent. In fact, both magnesium and manganese have an inhibitory effect on the RNA triphosphatase activity. Based on the results of our RNA binding studies, we demonstrated that the presence of metal ions does not significantly inhibit the binding of RNA to the enzyme. The fact that the flaviviral enzymes do not require a metal cofactor for their RNA triphosphatase activity is somehow surprising given that they require magnesium for their NTPase/helicase activity, and that both activities share a common active site [53]. Metal ions have the potential of fulfilling multiple functional roles in phosphohydrolase catalysis, including: i) increasing the affinity of the enzyme for the

RNA substrate; ii) increasing the stability of the protein; iii) being directly involved in catalysis by promoting the activation of nucleophiles; and iv) stabilizing the transition state. It is clear that the phosphohydrolase reaction requires a very precise alignment between the residues in the active site of the protein, the substrate, and the metal ion cofactor. The RNA triphosphatase of *S. cerevisiae* constitutes a good example of this complex metal ion requirement. For this enzyme, the hydrolysis of RNA triphosphate ends is activated by magnesium, but not by manganese or cobalt, while the NTPase activity is supported by manganese and cobalt, highlighting the importance of the metal ion cofactors in catalysis [22]. The metal ions probably modify the coordination geometry, or induce local conformational perturbations in the active site residues that ultimately influence substrate specificity [46]. A similar situation is most likely occurring for the WNV NS3 protein. Although the complete understanding of the mechanisms underlying the NS3-mediated phosphohydrolase is still incomplete, characterization of the biochemical properties of the protein should provide the basis for further studies in this direction.



*Acknowledgements:* We thank Dr. Hugues Charest from the Laboratoire de santé publique du Québec for the generous gift of the WNV RNA. We also thank Dr. Simon Labbé for helpful comments on the manuscript. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. M.B. is a New Investigator Scholar from the Canadian Institutes for Health Research.

## References

- [1] Bernard, K.A., Maffei, J.G., Jones, S.A., Kauffman, E.B., Ebel, G., Dupuis, A.P., Ngo, K.A., Nicholas, D.C., Young, D.M., Shi, P.Y., Kulasekera, V.L., Eidson, M., White, D.J., Stone, W.B., and Kramer, L.D. (2001). West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 679-685.
- [2] Petersen, L.R. and Roehrig, J.T. (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 611-614.
- [3] Sampson, B.A., Ambrosi, C., Charlot, A., Reiber, K., Veress, J.F., and Armbrustmacher, V. (2000). The pathology of human West Nile Virus infection. *Hum. Pathol.* 31, 527-531.
- [4] Pepperell, C., Rau, N., Krajden, S., Kern, R., Humar, A., Mederski, B., Simor, A., Low, D. E., McGeer, A., Mazzulli, T., Burton, J., Jaigobin, C., Fearon, M., Artsob, H., Drebot, M.A., Halliday, W., and Brunton, J. (2003). West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario. *Can. Med. Ass. J.* 168, 1399-1405.
- [5] Buckley, A., Dawson, A., Moss, S.R., Hinsley, S.A., Bellamy, P.E. and Gould, E.A. (2003). Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J. Gen. Virol.* 84, 2807-2817.
- [6] Heinz, F.X., Purcell, M.S., Gould, E.A., Howard, C.R., Houghton, M., Moormann, R.J. M., Rice, C.M. and Thiel, H.J. (2000). Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy* (Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., and Bishop, D.H.L., eds), pp. 860-878, Academic press, San Diego.

- [7] Granwehr, B.P., Lillibridge, K.M., Higgs, S., Mason, P.W., Aronson, J.F., Campbell, G.A. and Barrett, A.D.T. (2004). West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect. Dis.* 4, 547-556.
- [8] Brinton, M.A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 371-402.
- [9] Lanciotti, R.S., Roehrig, J.T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K.E., Crabtree, M.B., Scherret, J.H., Hall, R.A., MacKenzie, J.S., Cropp, C.B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H.M., Stone, W., McNamara, T., and Gubler, D.J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286, 2333-2337.
- [10] Nowak, T., Farber, P.M. Wengler, G., and Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169, 365-376.
- [11] Wengler, G., Czaya, G., Farber, P.M., and Hegemann, J.H. (1991). *In vitro* synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J. Gen. Virol.* 72, 851-858.
- [12] Wengler, G. and Wengler, G. (1991). The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* 184, 707-715.
- [13] Wengler, G. and Wengler, G. (1993). The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* 197, 265-273.

- [14] Cleaves, G.R. and Dubin, D.T. (1979). Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* 96, 159-65.
- [15] Furuichi, Y. and Shatkin, A.J. (2000). Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. *Adv. Virol. Res.* 55, 135-184.
- [16] Shuman, S. (2000). Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 66, 1-40.
- [17] Shibagaki, Y., Itoh, N., Yamada, H., Nagata, S., and Mizumoto, K. (1992). mRNA capping enzyme. Isolation and characterization of the gene encoding mRNA guanylyltransferase subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267, 9521-9528.
- [18] Schwer, B. and Shuman, S. (1994). Mutational analysis of yeast mRNA capping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4328-4332.
- [19] Mao, X., Schwer, B., and Shuman, S. (1996). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ABD1 gene: cap methyltransferase activity is essential for cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 16, 475-480.
- [20] Wang, S. P. and Shuman, S. (1997). Structure-function analysis of the mRNA cap methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272, 14683-14689.
- [21] Tsukamoto, T., Shibagaki, Y., Imajoh-Ohmi, S., Murakoshi, T., Suzuki, M., Nakamura, A., Gotoh, H., and Mizumoto, K. (1997). Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5'-triphosphatase, which is essential for cell viability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 116-122.
- [22] Ho, C.K., Pei, Y., and Shuman, S. (1998). Yeast and viral RNA 5' triphosphatases comprise a new nucleoside triphosphatase family. *J. Biol. Chem.* 273, 34151-34156.
- [23] Martins, A. and Shuman, S. (2000). Mechanism of phosphoanhydride cleavage by baculovirus phosphatase. *J. Biol. Chem.* 275, 35070-35076.

- [24] Changela, A., Ho, C.K., Martins, A., Shuman, S., and Mondragon, A. (2001). Structure and mechanism of the RNA triphosphatase component of mammalian mRNA capping enzyme. *EMBO J.* 20, 2575-2586.
- [25] Gross, C.H. and Shuman, S. (1998). Characterization of a baculovirus-encoded RNA 5'-triphosphatase. *J. Virol.* 72, 7057-7063.
- [26] Itoh, N., Mizumoto, K., and Kaziro, Y. (1984). Messenger RNA guanylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 259, 13930-13936.
- [27] Shuman, S. (1990). Catalytic activity of vaccinia mRNA capping enzyme subunits coexpressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 11960-11966.
- [28] Yamada-Okabe, T., Mio, T., Matsui, M., Kashima, Y., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1998). Isolation and characterization of the *Candida albicans* gene for mRNA 5'-triphosphatase: association of mRNA 5'-triphosphatase and mRNA 5'-guanylyltransferase activities is essential for the function of mRNA 5'-capping enzyme *in vivo*. *FEBS Lett.* 435, 49-54.
- [29] Lima, C.D., Wang, L.K., and Shuman, S. (1999). Structure and mechanism of yeast RNA triphosphatase: an essential component of the mRNA capping apparatus. *Cell* 99, 533-543.
- [30] Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., and Kaariainen, L. (2000). Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J. Biol. Chem.* 275, 17281-17287.
- [31] Bisailon, M. and Lemay, G. (1997). Characterization of the reovirus lambda1 protein RNA 5'-triphosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 29954-29957.

- [32] Bartelma, G. and Padmanabhan, R. (2002). Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology* 299, 122-132.
- [33] Benarroch, D., Selisko, B., Locatelli, G.A., Maga, G., Romette, J.L., and Canard, B. (2004). The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are  $Mg^{2+}$ -dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* 328, 208-218.
- [34]. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.
- [35] Cheng, Y. and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- [36] Bougie, I., Parent, A., and Bisailon, M (2004) Thermodynamics of ligand binding by the yeast mRNA-capping enzyme reveals different modes of binding. *Biochem. J.* 384, 411-420.
- [37] Bisailon, M and Bougie, I. (2003) Investigating the role of metal ions in the catalytic mechanism of the yeast RNA triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 278, 33963-33971.
- [38] Painter, G.R., Wright, L.L., Hopkins, S., and Furman, P.A. (1991) Initial binding of 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates to human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 266, 19362-19368.
- [39] Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies *Biochemistry* 15, 672-680.

- [40] Record, M.T., Lohman, M.L., and de Haseth, P.L. (1976) Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J. Mol. Biol.* 107, 145-158
- [41] Andrade, M.A., Chacon, P., Merelo, J.J., and Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.* 6, 383-390
- [42] Labowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> Ed., pp.237-266, Kluwer/Plenum, New York.
- [43] Beaudette, N.V. and Langerman, N. (1980) The thermodynamics of nucleotide binding to proteins. *Crit. Rev. Biochem.* 9, 145-169
- [44] Luo, Y. and Shuman, S. (1993) RNA binding properties of vaccinia virus capping enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 21253-21262.
- [45] Bisaillon, M. and Bougie, I. (2003). Investigating the role of metal ions in the catalytic mechanism of the yeast RNA triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 278, 33963-33971.
- [46] Lamarre, D., Anderson, P.C., Bailey, M. and 25 other authors (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426, 186-189.
- [47] Nall, T.A., Chappell, K.J., Stoermer, M.J., Fang, N.X., Tyndall, J.D.A., Young, P.R., and Fairlie, D.P. (2004). Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. *J. Biol. Chem.* 279, 48535-48542.
- [48] Pei, Y., Schwer, B., Hausmann, S., and Shuman, S. (2001). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* RNA triphosphatase. *Nucleic Acids Res.* 29, 387-396.

- [49] Gong, C., Martins, A., and Shuman, S. (2003). Structure-function analysis of *Trypanosoma brucei* RNA triphosphatase and evidence for a two-metal mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 50843-50852.
- [50] Gong, C. and Shuman, S. (2002). *Chlorella* virus RNA triphosphatase. Mutational analysis and mechanism of inhibition by tripolyphosphate. *J. Biol. Chem.* 277, 15317-15321.
- [51] Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., and Caron, P.R. (1997). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89-100.
- [52] Li, Y.I., Shih, T.W., Hsu, Y.H., Han, Y.T., Huang, Y.L., and Meng, M. (2001). The helicase-like domain of plant potexvirus replicase participates in formation of RNA 5' cap structure by exhibiting RNA 5'-triphosphatase activity. *J. Virol.* 75, 12114-12120.
- [53] Borowski, P., Niebuhr, A., Mueller, O., Bretner, M., Felczak, K., Kulikowski, T., and Schmitz, H. (2001). Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. *J. Virol.* 75, 3220-3229.



## Figure legends

Fig. 1. Expression, purification, and RNA triphosphatase activity of recombinant WNV NS3 protein. (a) An aliquot (2  $\mu$ g) of the purified preparation of the NS3 protein was analyzed by electrophoresis through a 12.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS and visualized by staining with Coomassie Blue Dye. The positions and sizes (in kDa) of the size markers are indicated on the left. (b) Reaction mixtures containing an RNA substrate radiolabeled at its terminal  $\gamma$ -phosphate was incubated with the NS3 protein (25 nM) for 60 min at 37 °C in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 5 mM DTT. The reactions were quenched by adding 2  $\mu$ l of 5 M formic acid. Aliquots of the mixtures were applied to a polyethyleneimine-cellulose TLC plate, which was developed with 0.75 M potassium phosphate, pH 4.3. The release of  $^{32}$ Pi was quantitated by scanning the TLC plate with a phosphorimager. The extent of phosphate release is plotted as a function of input protein. (c) Kinetic analysis of RNA hydrolysis. The extent of phosphate release is plotted as a function of RNA concentration. A double-reciprocal plot of the data is shown in the *right-hand corner*. (d) Standard RNA triphosphatase reactions were performed in the presence of magnesium (■) and manganese (O) metal ions. (e) The effect of increasing ionic strength on the RNA triphosphatase was investigated. Increasing concentrations of KCl were added to the reactions to generate the desired ionic strength. (f) The effect of temperature on the reaction was also analyzed. (g) NS3-mediated RNA triphosphatase reaction as a function of pH. (h) Inhibition of the RNA triphosphatase activity by tripolyphosphate. Standard reactions were performed in the presence of pyrophosphate (P<sub>i</sub>) or tripolyphosphate (PPP<sub>i</sub>). The extents of hydrolysis were normalized to those of

the control reactions for which no inhibitors were included. The normalized activities are plotted as a function of the inhibitors concentrations.

Fig. 2. Titration of NS3 with RNA. (a) Background corrected fluorescence emission spectra of NS3. 1, Purified protein in 50 mM Tris-HCl, and 50 mM KOAc, pH 7.5; 2, Purified protein after a 1-hour exposure to an 8 M solution of urea at 25°C. Fluorescence spectra were recorded at an excitation wavelength of 290 nm. (b) Molar fluorescence of NS3. Various concentrations of the purified NS3 protein were assayed in 50 mM Tris-HCl, and 50 mM KOAc, pH 7.5. Emission was monitored at 338 nm and excitation was performed at 290 nm. (c) Increasing amounts of RNA were added to a 1  $\mu$ M solution of the enzyme in binding buffer (50 mM Tris-HCl and 50 mM KOAc, pH 7.5) and the emission spectrum was scanned from 310 to 440 nm upon excitation at 290 nm. (d) A saturation isotherm can be generated from these data by plotting the change in fluorescence intensity at 338 nm as a function of added RNA.

Fig. 3. Characterization of the interaction between RNA and NS3. (a) A van't Hoff plot for the interaction between RNA and NS3 is shown. The effect of temperature on the association constant was evaluated at pH 7.0. (b) The effect of increasing ionic strength on the apparent dissociation constant of NS3 for RNA was investigated. Increasing concentrations of KCl were added to the reactions to generate the desired ionic strengths. (c) Kinetic analysis of real-time binding of RNA to the NS3 protein. A 1  $\mu$ M solution of the enzyme was incubated with 100  $\mu$ M RNA. Emission was monitored for 300 sec at 338 nm, and excitation was performed at 290 nm. (d) Affinity of the NS3 protein for RNA of x (■), x (◐), x (●), and x (○) nucleotides. Increasing amounts of RNA were added to a x  $\mu$ M solution of the enzyme in binding buffer (50

mM Tris-HCl and 50 mM KOAc, pH 7.5) and the emission spectrum was scanned from 310 to 440 nm upon excitation at 290 nm. A saturation isotherm can be generated from these data by plotting the change in fluorescence intensity at 338 nm as a function of added RNA.

Fig. 4. Structural consequences of RNA binding to the NS3 protein. (a) A circular dichroism (CD) spectrum was recorded for the unliganded NS3 protein (8  $\mu$ M). The spectrum was recorded from 200 to 350 nm, and the average of 3 wavelength scans is presented. (b) Near-UV CD spectra were recorded for the unliganded NS3 protein (black line), and the protein bound to RNA (red line) as indicated. Formation of the enzyme-RNA complex was induced by incubating the NS3 protein (8  $\mu$ M) with 100  $\mu$ M RNA. The spectra were recorded from 250 to 400 nm, and the average of 3 wavelength scans is presented.

Fig. 5. Binding of ANS to the NS3 protein during urea denaturation. The NS3 protein was incubated in the absence (■) or presence of 100  $\mu$ M RNA (□), and unfolded with various concentrations of urea at 22 °C for 1 hour. Fluorescence emission was monitored after ANS addition (50  $\mu$ M) at an excitation wavelength of 380 nm. The integrated fluorescence area between 400 and 600 nm was evaluated.

Fig. 6. Unfolding equilibrium of the NS3 protein. (A) Thermal denaturation of the NS3 enzyme at a concentration of 8  $\mu$ M. Circular dichroism spectra were recorded from 200 to 260 nm at 20 (green), 30 (blue), 40 (red), 50 (yellow), 60 (cyan), and 70 °C (purple). (B) Thermal denaturation of the NS3 enzyme (8  $\mu$ M) in the presence of 100  $\mu$ M RNA. Circular dichroism spectra were recorded from 200 to 260 nm at 20

(green), 30 (blue), 40 (red), 50 (yellow), 60 (cyan), and 70 °C (purple). (C) Thermal denaturation was recorded for the unliganded NS3 protein (black line), and the protein incubated in the presence of 100  $\mu$ M RNA (red line). Circular dichroism spectra were recorded at a constant wavelength of 222 nm from 5 to 110 °C at a protein concentration of 8  $\mu$ M.

Fig. 7. Three-dimensional model of the WNV NS3 protein. (a) Ribbon representations of the predicted three-dimensional structure of the WNV NS3 protein. The model was generated with the Deep View program (28). The structure of the (b) hepatitis C virus NS3 helicase domain is also shown.

Table 1

Thermodynamic unfolding parameters of the WNV NS3 protein  
measured by thermal denaturation

Protein	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{VH}$ (kJ / mol)	$\Delta S$ (kJ / mol / K)
NS3	43.68	-192.8	-0.61
NS3 · RNA	44.34	-319.8	-1.0

The thermodynamic parameters of unfolding  $\Delta H_{VH}$  (van't Hoff enthalpy of denaturation) and  $\Delta S$  (entropy of denaturation) were determined by thermal denaturation of the NS3 enzyme bound to various substrates. Temperature-induced denaturations were monitored by circular dichroism spectroscopy at 222 nm.

Figure 1

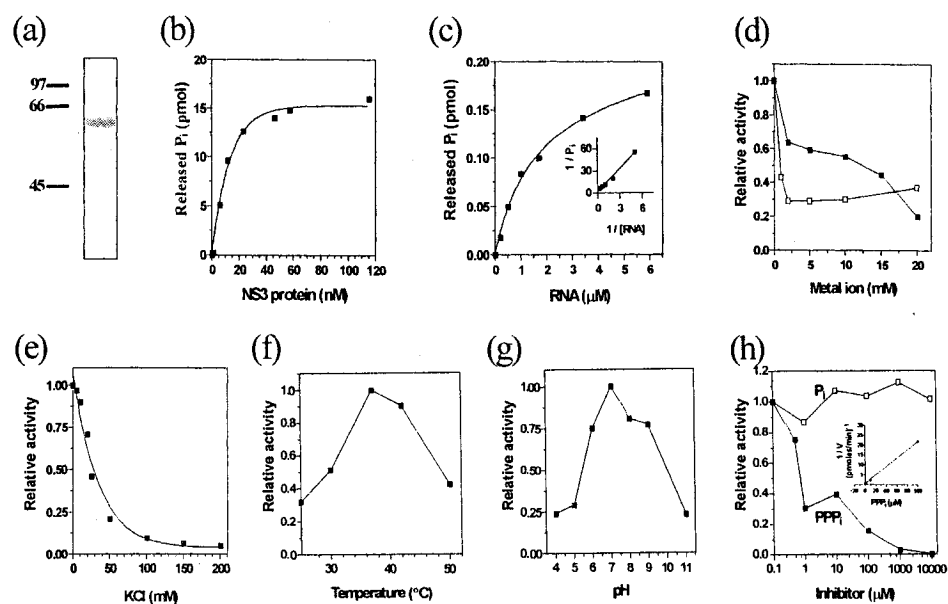


Figure 2

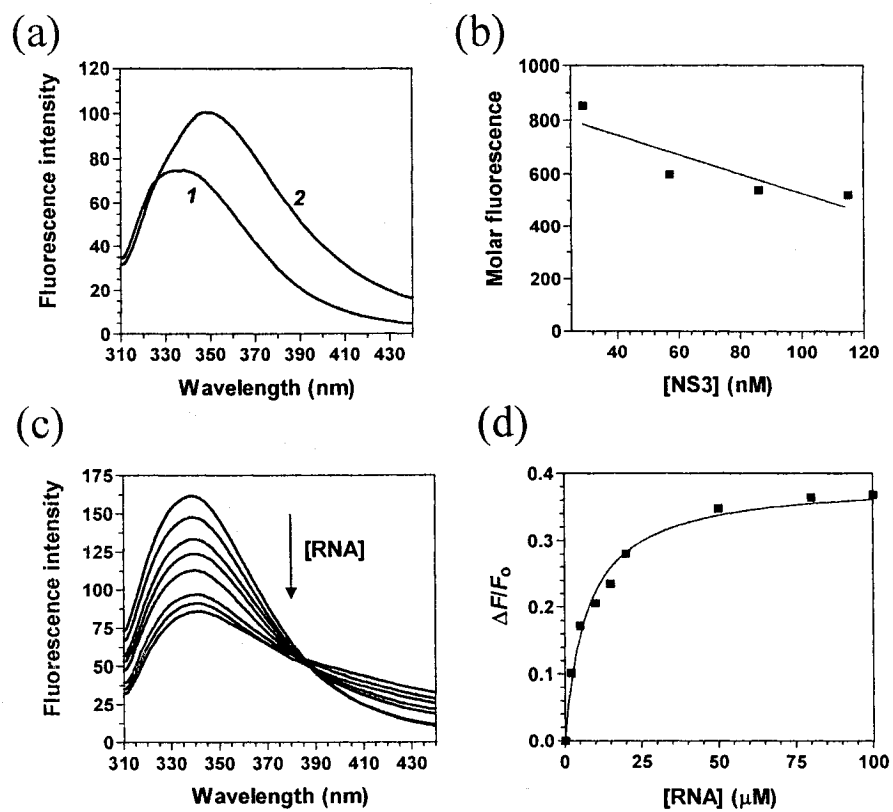


Figure 3

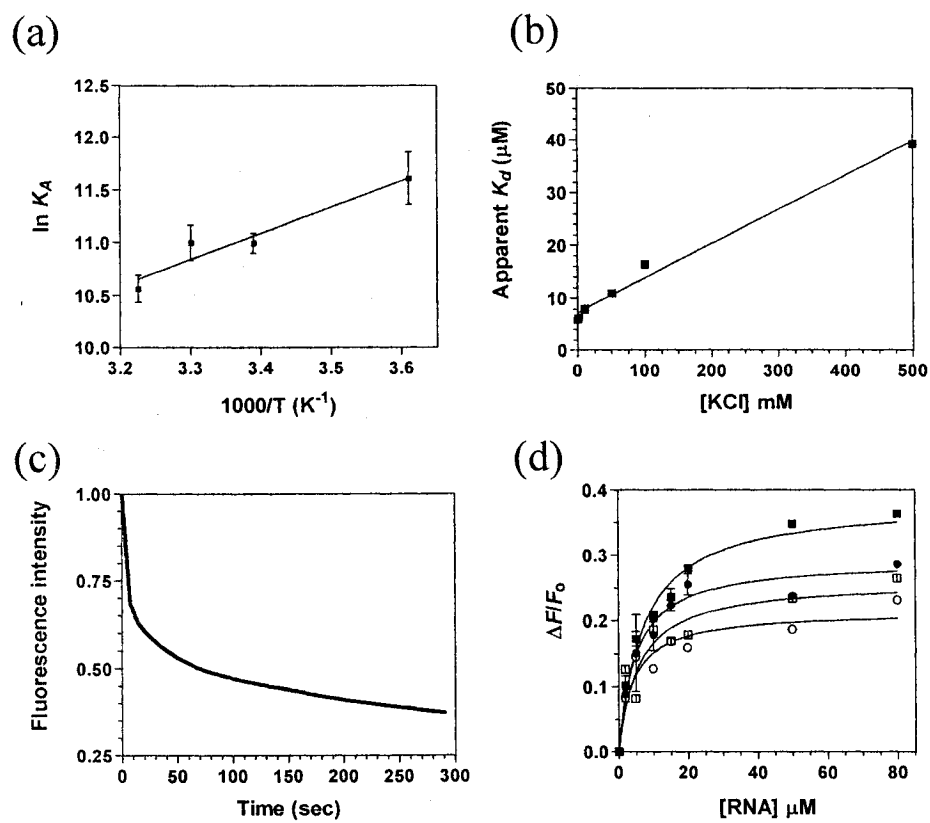




Figure 4

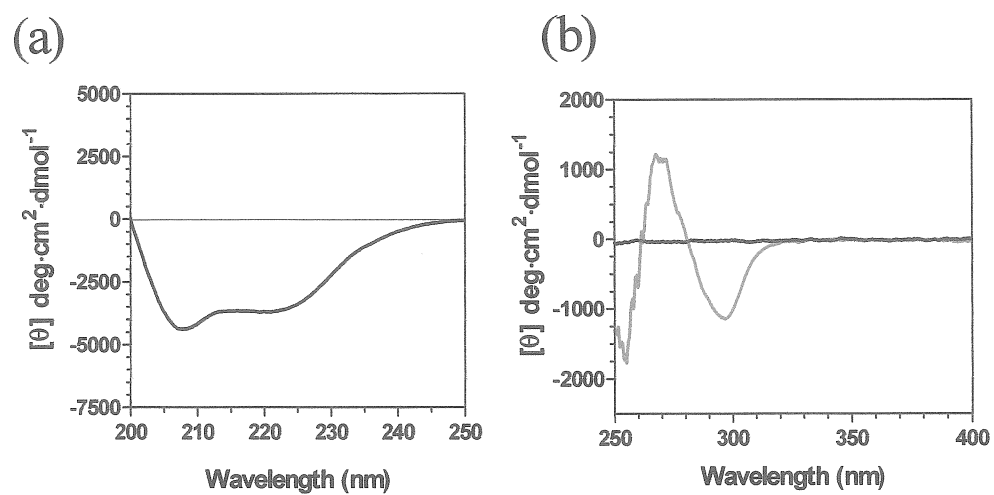


Figure 5

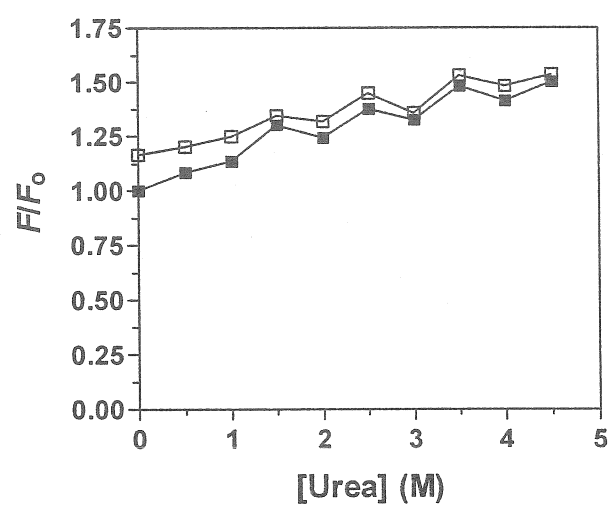
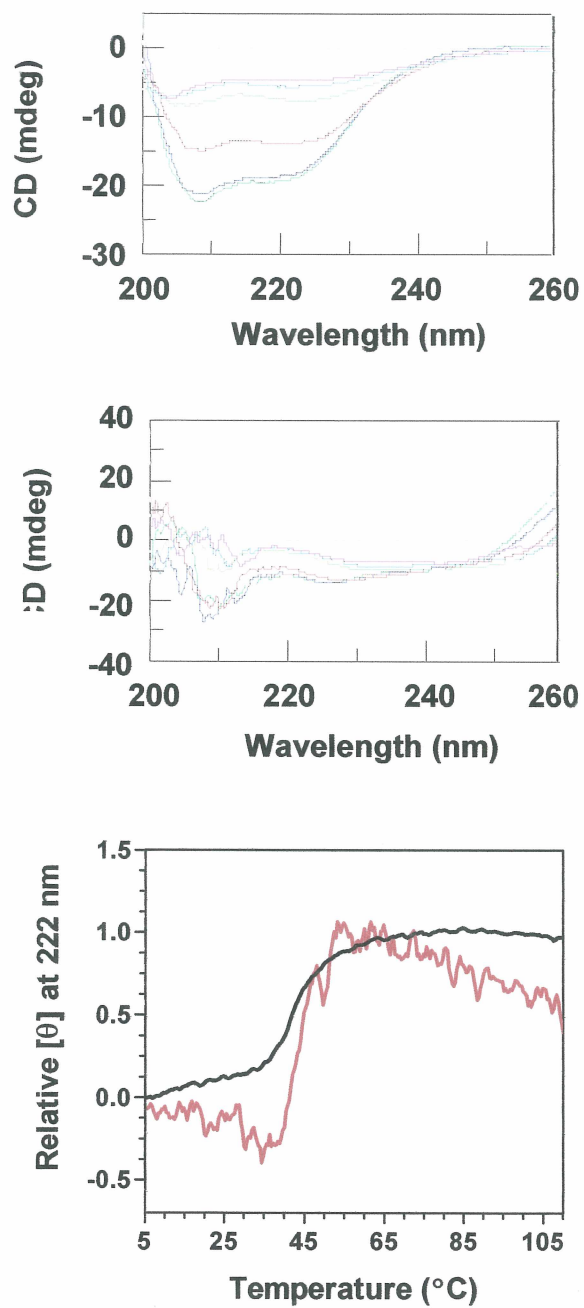
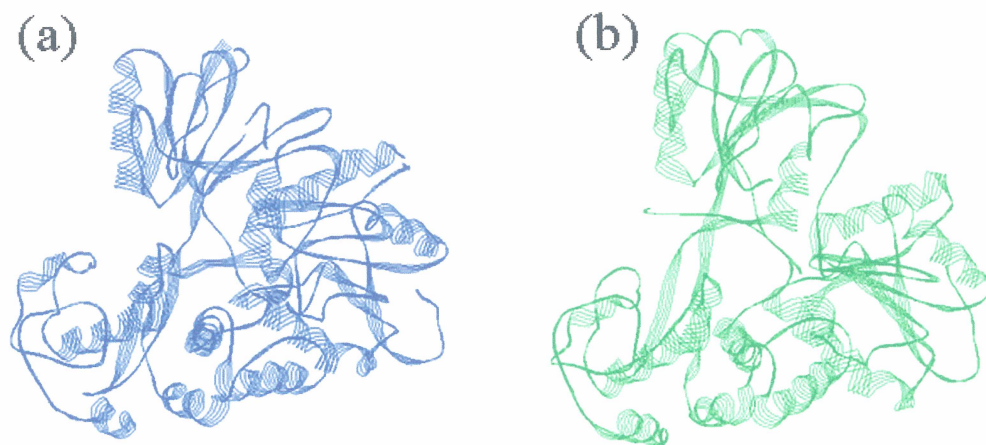


Figure 6



**Figure 7**

Caractérisation de l'effet des ions métalliques sur la stabilité de la polymérase du virus  
del'hépatite C

ARTICLE 2

**Ines Benzaghoul**, Isabelle Bougie et Martin Bisaillon

Effect of metal ion binding on the structural stability of the hepatitis C virus RNA  
polymerase (2004), *J. Biol. Chem.* 279(48):49755-61.

(Voir annexe pour la version publiée de l'article)

Département de Biochimie  
Université de Sherbrooke  
Sherbrooke, Québec, Canada

### **Mon implication dans le travail**

J'ai effectué la majorité des expériences qui se rapportent à la stabilité de la structure de la protéine NS5B en présence de  $Mg^{2+}$ .

L'expression de la protéine et sa purification ainsi que les figures illustrés dans le présent article, qui se rapportent à la stabilité de la structure et la conformation de la protéine NS5B ont été réalisées par moi-même à l'exception de :

- Détermination de l'activité enzymatique de la polymérase NS5B en fonction de concentration croissante d'hydrochlorure de guanidium.
- Détermination de l'activité enzymatique de la polymérase NS5B en fonction de différentes températures.
- Les mutations effectuées aux résidus de la protéine NS5B impliqués dans la liaison au  $Mg^{2+}$  ainsi que les tests de liaison de la protéine mutante au  $Mg^{2+}$ .

## **Effect of Metal Ion Binding on the Structural Stability of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase**

Ines Benzaghoul, Isabelle Bougie, and Martin Bisaillon<sup>‡</sup>

*Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke,  
Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada*

<sup>‡</sup>To whom correspondence should be addressed:

Martin Bisaillon

Département de biochimie

Faculté de médecine

Université de Sherbrooke

3001 12e avenue

Sherbrooke, Québec, Canada

J1H 5N4

Tel: (819) 564-5227

Fax: (819) 564-5340

E-mail: Martin.Bisaillon@USherbrooke.ca

Running title: Stability of the HCV RNA Polymerase

## Summary

The RNA polymerase activity of the hepatitis C virus, a major human pathogen, has previously been shown to be supported by metal ions. In the present study, we report a systematic analysis of the effect of metal ion binding on the structural stability of the hepatitis C virus RNA polymerase. Chemical and thermal denaturation assays revealed that the stability of the protein is significantly increased in the presence of metal ions. Structural analyses clearly established that metal ion binding increases hydrophobic exposure on the RNA polymerase surface. Furthermore, our denaturation studies, coupled to polymerization assays, demonstrate that the active site region of the polymerase is more sensitive to chemical denaturant than other structural scaffolds. We also report the first detailed study of the thermodynamic parameters involved in the interaction between the hepatitis C virus RNA polymerase and metal ions. Finally, a mutational analysis was also performed in order to investigate the importance of Asp220, Asp318, and Asp319 for metal ion binding. This mutational study underscores a strict requirement for each of the residues for metal binding, indicating that the active center of the HCV RNA polymerase is intolerant to virtually any perturbations of the metal coordination sphere, thereby highlighting the critical role of the enzyme-bound metal ions. Overall, our results indicate that metal ions play a dual modulatory role in the RNA polymerase reaction by promoting both a favourable geometry of the active site for catalysis, and by increasing the structural stability of the enzyme.



## Introduction

Recent estimates indicate that more than 170 million people worldwide are infected with the hepatitis C virus (HCV) (1). It is estimated that about 80% of patients with acute HCV infection will progress to chronic hepatitis. Of these, 20% will develop cirrhosis, and 1 to 5% will develop hepatocellular carcinoma (2-5). There is thus an urgent need for the development of antiviral drugs aimed at inhibiting this pathogen.

The HCV non-structural 5B protein (NS5B) has been shown to be an RNA-dependent RNA polymerase (6-11). The protein contains characteristic motifs, such as the GDD motif, shared by RNA-dependent RNA polymerases, and is believed to be responsible for the genome replication of HCV (12). The NS5B protein has been extensively studied during the past few years since it is one of the major targets for the development of antiviral drugs (7, 13-25). The enzyme can utilize a wide range of RNA molecules as template, although it appears to prefer certain homopolyribonucleotides (26). By itself, NS5B appears to lack specificity for HCV RNA and displays activity on heterologous nonviral RNA (3). This lack of specificity for HCV RNA supports the notion that additional viral or cellular factors are required for specific recognition of the viral replication signal.

The HCV RNA polymerase activity has been shown to be supported by both magnesium and manganese ions (7, 13, 21-25). However, the recent characterization of the affinity of the enzyme for metal ions suggests that magnesium is the cation that is used *in vivo* during polymerization (27). Analysis of the crystal structure of NS5B revealed that the protein is folded into characteristic fingers, palm, and thumb subdomains (28, 29). The particular fold adopted by the palm subdomain is shared by many proteins that bind

nucleotides and/or nucleic acids (30). The crystal structure of the HCV RNA polymerase showed that it contains two absolutely conserved aspartic acid residues that coordinate two metal ions in the active site of the protein (31). These two metal ions are in contact with both the phosphate of the nucleotide and several acidic amino acids residues (31). A catalytic mechanism has been proposed for polymerases in which one metal ion is involved in both positioning the substrate and in the activation of an incoming nucleophile (32). Nucleophilic attack would then generate a trigonal bipyramidal transition state which would be stabilized by both metal ions. The second metal ion also stabilizes the negative charge that appears on the leaving 3' oxygen, thus facilitating its departure from the phosphate. Analysis of the NS5B protein crystal structure indicated that the two metal ions are about 3.6 Å apart in the active site of the protein (31). Crystallographic and fluorescence spectroscopy data indicate that metal ion binding seems to be limited to the active site region, and does not involve other subdomains of the protein (27, 31). Finally, we and others recently demonstrated that the enzyme undergoes conformational changes upon binding of metal ions (27, 33). However, this process does not significantly stimulate the binding of the enzyme to the RNA or NTP substrates (27).

In the present study, we report a systematic analysis of the effect of metal ion binding on the structural stability of the HCV RNA polymerase. Using fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and denaturation assays, we demonstrate that the binding of metal ions to the enzyme is critical for both structural stabilization and catalysis. Mutational analysis also revealed the importance of specific aspartate residues for metal binding. Our data provide insights on the precise role of metal ions in the NS5B-mediated RNA polymerase reaction.

## Materials and Methods

### *HCV NS5B Expression and Purification*

The expression and purification of a truncated form of HCV NS5B protein (NS5BΔ21) lacking the last 21 amino acids of the protein were performed as described previously (27). Alanine substitutions were introduced into the NS5B gene by using the two-stage overlap extension method (34).

### *Fluorescence Measurements*

Fluorescence was measured using a Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer. Background emission was eliminated by subtracting the signal from either buffer alone, or buffer containing the appropriate quantity of substrate.

The extent to which ligands bind to the NS5B protein was determined by monitoring the fluorescence emission of a fixed concentration of proteins and titrating with a given ligand. The binding can be described by Equation 1,

$$K_d = \frac{[\text{NS5B}] [\text{ligand}]}{[\text{NS5B} \cdot \text{ligand}]} \quad (\text{eq. 1})$$

where  $K_d$  is the apparent dissociation constant,  $[\text{NS5B}]$  is the concentration of the protein,  $[\text{NS5B} \cdot \text{ligand}]$  is the concentration of complexed protein, and  $[\text{ligand}]$  is the concentration of unbound ligand.

The proportion of ligand-bound protein as described by Equation 1 is related to measured fluorescence emission intensity by Equation 2,

$$\Delta F / \Delta F_{max} = [\text{NS5B} \cdot \text{ligand}] / [\text{NS5B}]_{tot} \quad (\text{eq. 2})$$

where  $\Delta F$  is the magnitude of the difference between the observed fluorescence intensity at a given concentration of ligand and the fluorescence intensity in the absence of ligand,  $\Delta F_{max}$  is the difference at infinite [ligand], and  $[\text{NS5B}]_{tot}$  is the total protein concentration.

If the total ligand concentration,  $[\text{ligand}]_{tot}$ , is in large molar excess relative to  $[\text{NS5B}]_{tot}$ , then it can be assumed that  $[\text{ligand}]$  is approximately equal to  $[\text{ligand}]_{tot}$ . Equations 1 and 2 can then be combined to give Equation 3,

$$\Delta F / \Delta F_{max} = [\text{ligand}]_{tot} / (K_d + [\text{ligand}]_{tot}) \quad (\text{eq. 3})$$

The  $K_d$  values were determined from a nonlinear least square regression analysis of titration data by using Equation 3.

### *Thermodynamics of Binding*

The temperature dependence of the association constants ( $K_a$ ) for ligand binding was analyzed according to the van't Hoff isobaric equation, assuming that the entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) and the enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) remained constant over the whole range of temperatures (Equation 4).

$$\ln K_a = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (\text{eq. 4})$$

### ***Equilibrium Unfolding Experiments***

A 100 nM solution of NS5B was adjusted to the desired final concentration of guanidium hydrochloride (Gdm-HCl) and incubated for 60 min at 22°C. The parameters  $\Delta G_u^0$  (free energy of unfolding in the absence of denaturant),  $m$  (cooperativity of unfolding), and  $C_m$  (midpoint concentration of denaturant required to unfold half of the protein) were obtained as previously outlined using Equation 5,

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad (\text{eq. 5})$$

and Equation 6,

$$\Delta G_u = \Delta G_u^0 - m[\text{Gdm-HCl}] \quad (\text{eq. 6})$$

### ***In vitro Enzymatic Assay***

The incorporation of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP was measured as described previously (7). The standard reaction (50  $\mu$ l) was performed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM DTT, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 U of RNAGuard (Amersham Biosciences), 50 mM NaCl, with 0.2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>]UTP, 10  $\mu$ g/ml polyA/oligodT, and 1 mM cold UTP. The reactions were incubated at 18 °C for 2 hours, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The precipitable radioactivity was quantitated by liquid scintillation counting.

### ***Circular Dichroism Spectroscopy Measurements***

Circular dichroism (CD) measurements were performed with a Jasco J-810 spectropolarimeter. The samples were analyzed in quartz cells with pathlengths of 1

nm. Thermal transitions were monitored by following the change in ellipticity at 222 nm. The samples were heated from 20 °C to 95 °C, at a heating rate of 1 °C/min. The ellipticity results were expressed as mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , in degrees·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>. The fraction of unfolded protein at each temperature was determined by calculating the ratio  $[\theta_{222}]/[\theta_{222}]_d$ , where  $[\theta_{222}]_d$  is the molar ellipticity for the completely unfolded enzyme.

### ***ANS Binding Measurements***

Binding of ANS (1-anilino-8-naphtalenesulfonate) was evaluated by measuring the fluorescence enhancement of ANS (50 μM) upon excitation at a wavelength of 380 nm. The emission spectra were integrated from 400 to 600 nm.

### ***Quenching of HCV RNA Polymerase by Acrylamide***

Quenching experiments were performed at 22 °C by adding increasing concentrations of acrylamide. The excitation wavelength was set at 290 nm and the fluorescence emission spectra were scanned from 300 nm to 400 nm. The integration area between 330 and 360 nm was used for data analysis. The fluorescence quenching data in the presence of acrylamide were analyzed according to the Stern-Volmer equation (35):

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (\text{eq. 7})$$

where  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities in the absence or presence of the quencher, respectively.  $K_{sv}$  is the dynamic Stern-Volmer quenching constant, and  $[Q]$  is the quencher concentration.

When the Stern-Volmer displayed an upward curvature, the static quenching concept was used, and the experimental data were fitted to a revised Stern-Volmer equation:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]\exp(V[Q]) \quad (\text{eq. 8})$$

where  $V$  is the static quenching constant measuring the complex formation between acrylamide and the enzyme.

## Results

### *Expression, Purification, and Intrinsic Fluorescence Properties of the HCV RNA Polymerase*

In order to evaluate the role of metal ions in the NS5B-mediated RNA polymerase activity, the enzyme was expressed as described previously (27). SDS-PAGE analysis demonstrated that the 65-kDa NS5B protein was the predominant polypeptide in the purified fraction (Fig. 1A). The identity of the protein was also confirmed by immunoblotting analysis, using a monospecific antibody (data not shown). The fluorescence properties of the purified NS5B protein in standard buffer at 22°C are shown in figure 1B. Analysis of the background corrected fluorescence emission spectrum of the NS5B protein revealed an emission maximum ( $\lambda_{\text{max}} = 335$  nm) that is blue-shifted relative to that of free L-tryptophan, which under the same conditions is observed to be at 350 nm. Blue shifts of protein emission spectra have been ascribed to shielding of the tryptophan residues from the aqueous phase, a result of the protein's three-dimensional structure. Accordingly, denaturation of NS5B with 8M urea results in a red shift of  $\lambda_{\text{max}}$  towards 350 nm (Fig. 1B). Analysis of the molar intensity of the fluorescence emission spectrum of NS5B revealed a linear change of 0.16 fluorescence intensity units/nM of protein (Fig. 1B). This relatively small change can probably be attributed to small losses of proteins from solution through adhesion. All subsequent binding experiments were therefore performed at a protein concentration of 100 nM, with the assumption that the binding equilibrium was not complicated by the presence of an aggregation equilibrium.



### *Denaturation Studies*

In a recent study, we demonstrated that the HCV RNA polymerase undergoes subtle conformational changes upon the binding of metal ions, but this process does not significantly stimulate the binding of RNA or NTP substrates (27). Since metal ions have the potential to play both catalytic and structural roles in protein chemistry, we analyzed the effect of magnesium ions on the structural stability of the HCV RNA polymerase. The effect of metal ion binding on the NS5B structural stability was initially assessed by guanidium hydrochloride (Gdm-HCl) denaturation assays performed at 22°C. Upon an increase of the Gdm-HCl concentration, the fluorescence emission maximum of the unliganded NS5B protein shifted to 350 nm (data not shown), reflecting the transfer of tryptophan residues to a more polar environment. The unliganded protein structure reacted very sensitively to the slightest concentration changes in the lower concentration range between 0.5 and 3.0 M where the strongest effects on emission changes are observed (Fig. 2A). No changes could be observed at Gdm-HCl concentrations higher than 3.5 M. The  $C_m$  value (midpoint concentration of denaturant required to unfold half of the protein) was reached at 1.05 M Gdm-HCl. Protein denaturation assays were then performed in the presence of saturating concentrations of  $Mg^{2+}$  ions. The complete thermodynamic unfolding parameters were determined, and the values are presented in Table I. A significant stabilization of the NS5B structure was observed in the presence of magnesium ions, as reflected by the shift in the  $C_m$  value that was now reached at 1.91 M of Gdm-HCl (Figure 2A). The informative finding is that the stability of the enzyme is increased by 2.22 kJ·mol<sup>-1</sup> in the presence of  $Mg^{2+}$  ions.

The chemical denaturation assays were also analyzed in terms of catalytic activity. Two distinct approaches were undertaken to study the effect of denaturation on the catalytic activity of the protein. In the first approach, the HCV RNA polymerase was initially denatured with increasing concentrations of Gdm-HCl. The RNA polymerase activity of the protein was then monitored by incubating the denatured protein with magnesium, and a proper combination of template/primer/nucleotide. The data indicated that the RNA polymerase activity of the enzyme was reduced by 50% at concentration of 0.81 M Gdm-HCl (Fig. 2B). In the second approach, the NS5B protein was initially incubated with magnesium. The protein-ion complex was then denatured with Gdm-HCl, and subsequently assayed for RNA polymerase activity. Using this second approach, a concentration of 1.32 M Gdm-HCl was necessary to reduce the NS5B-mediated RNA polymerase activity by half (Fig. 2B). Overall these data indicate that the binding of metal ions to the HCV RNA polymerase protects the enzyme against chemical denaturation. By comparison with the structural stability assay (Fig. 2A), these data suggest that the active site region of the enzyme is more sensitive to chemical denaturant than other structural scaffolds.

The effects of metal binding on the structural stability of the HCV RNA polymerase were also assessed by circular dichroism spectroscopy. Thermal denaturation assays were performed both in the presence and absence of  $Mg^{2+}$  ions, and unfolding of the enzyme was evaluated by monitoring the changes in the  $\alpha$ -helix content of the protein (222 nm). Thermal denaturation of the unliganded NS5B protein initially revealed a midpoint of thermal transition ( $T_m$ ) of 40.2 °C (Fig. 3A). Addition of saturating concentrations of  $Mg^{2+}$  ions resulted in a shift of the  $T_m$  value to 45.7 °C.

These results demonstrate that the binding of  $Mg^{2+}$  ions to the NS5B protein significantly increases the structural stability of the enzyme.

Thermal stability was also monitored in terms of catalytic activity. This was done by preincubating either the unliganded NS5B protein, or the protein saturated with magnesium ions, for 15 minutes at various temperatures, followed by quenching on ice. The protein samples were then assayed for RNA polymerase activity at 18 °C in the standard RNA polymerase buffer. The thermal inactivation curves are shown in figure 3B. The results indicate that preincubation of the HCV RNA polymerase with  $Mg^{2+}$  ions protects the enzyme against thermal denaturation. The inactivation curve of the protein preincubated with magnesium ions is shifted 15 °C to the right relative to the enzyme that had not been preincubated with metal ions (Figure 3B). Note that all of the denaturation assays, performed either with increasing Gdm-HCl concentrations or by thermal denaturation, revealed monophasic unfolding curves, suggestive of a two-state unfolding model. No intermediate form could be detected during the unfolding process.

### *Thermodynamic Analysis*

Using a combination of crystallography, fluorescence and circular dichroism, the HCV RNA polymerase has previously been shown to interact with metal ions (27, 31, 33). In the present study, a thermodynamic investigation of the metal ion binding process was initiated in order to provide additional insight into the energetic and entropic characteristics of the binding reaction. Using fluorescence spectroscopy, the thermodynamic parameters of the binding reaction were evaluated by determining the temperature dependence of the association constant ( $K_{as}$ ) for  $Mg^{2+}$  ions. Analysis of

the van't Hoff plot for the initial interaction between  $\text{Mg}^{2+}$  and the HCV RNA polymerase reveals that the interaction is connected with a high enthalpy of association,  $\Delta H^\circ = -33.4 \text{ kJ/mol}$  (Fig. 4). Furthermore, the binding reaction is clearly enthalpy driven with the resultant  $\Delta S^\circ = -88.7 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ . These data indicate that the reaction is spontaneous at low temperatures, but tends to reverse at higher temperatures. Accordingly, the binding of metal ions could not be repeatedly observed at temperatures higher than  $50^\circ\text{C}$  (data not shown). This can most probably be attributed to the denaturation of the protein that occurs at higher temperatures, and the concomitant destabilization of the active site.

#### ***Metal Ion Binding Increases Hydrophobic Exposure at Low Urea Concentrations***

In order to gain additional insights into the structural modifications that occur upon metal ion binding, we investigated the binding of structural fluorescent reporters to the enzyme. The exposure of the hydrophobic area of the HCV RNA polymerase was evaluated by measuring the binding of ANS (1-anilino-8-naphtalenesulfonate) to the protein. ANS is a reporter of exposed hydrophobic surfaces on proteins that binds with high affinity to hydrophobic patches, which results in an enhancement of ANS intrinsic fluorescence (36). Our data revealed that the unliganded NS5B protein binds very weakly to ANS, probably reflecting limited hydrophobic regions at the surface of the protein (Fig. 5). However, a significant increase of the ANS fluorescence is observed when the protein is incubated in the presence of saturating concentrations of magnesium ions (Fig. 5). As expected, increasing the urea concentrations resulted in a drastic decrease of the emission intensity, as the protein with bound  $\text{Mg}^{2+}$  became unfolded by the denaturant. Overall, these data indicate that magnesium ion binding increases hydrophobic exposure on the HCV RNA polymerase surface.

To better understand the conformational changes that occur following the binding of magnesium ions to the HCV RNA polymerase, quenching experiments were performed in the presence of acrylamide. Acrylamide is a non-selective quencher of proteins that can penetrate into the interior of the protein matrix (37). In the absence of denaturant, acrylamide displayed greater accessibility for the NS5B protein bound to magnesium ions, reflecting the structural difference between the unliganded NS5B protein and the protein bound to  $Mg^{2+}$  ions (Fig. 6). As observed in our ANS binding assays, acrylamide has increased access to the interior of the NS5B protein when the protein is bound to magnesium ions (Fig. 6). The various quenching constants are summarized in Table II.

The acrylamide quenching experiments were then performed in the presence of increasing urea concentrations. As seen in figure 6, metal ion binding provided significant protection against acrylamide quenching when the protein was denatured with high concentrations of urea. This protection was particularly evident in the presence of 4.5M urea, where the binding of  $Mg^{2+}$  ions clearly protected the NS5B protein from acrylamide quenching. Clearly, the acrylamide quenching assays performed in the presence of increasing urea concentrations indicate that magnesium ion binding to the HCV RNA polymerase significantly increases the structural stability of the protein.

### ***Mutational analysis***

Analysis of the crystal structure of the HCV RNA polymerase has revealed the presence of two metal ions that lie 3.6 Å apart in the active center of the enzyme (31). The side chains of Asp220 and Asp318 have been shown to bridge the two metal ions,

whereas the side chain of Asp319 interacts with only one of the two metal ions (31). The respective importance of each of these side chains for catalysis has been previously confirmed by mutational analysis (9). In order to investigate if the metal ion binding activity detected in our assays is exclusively dependent on the active center of the HCV RNA polymerase, we synthesized a series of enzymatic mutants. Asp220, Asp318, and Asp319 were substituted for alanine, and the mutant polypeptides were expressed and purified in parallel with the wild-type enzyme. The effects of single alanine mutations on the metal ion binding activity were investigated by fluorescence spectroscopy. No significant changes in fluorescence intensity could be observed upon the addition of  $Mg^{2+}$  ions (up to 100 mM) to these alanine mutants (Fig. 7A). We conclude that each of the three aspartate residues (Asp 220, 318, and 319) is critical for metal ion binding. The thermodynamic stability of these mutants was then analyzed by guanidium-hydrochloride denaturation (Fig. 7B). In contrast to the wild-type enzyme, no significant stabilization was observed when the D220A mutant was incubated with a high concentration of  $Mg^{2+}$  ions (50 mM). Similar results were obtained for both the D318A and D319A mutants. Finally, no significant increase of the ANS fluorescence was observed when the D220A mutant proteins were incubated with  $Mg^{2+}$  (Fig. 7C). Again, similar results were obtained for the two other alanine mutants.

### ***Binding of other metal ions***

Previous studies have shown that certain divalent ions, such as zinc, copper, and nickel, do not support the catalytic activity of the HCV RNA polymerase, but can very efficiently inhibit the activity of the enzyme (13, 25). Using fluorescence spectroscopy, we have been unable to efficiently detect the binding of these ions to the

HCV RNA polymerase. Since no modifications in the fluorescence intensity are observed upon the addition of zinc, copper, and nickel, we conclude that these ions do not bind in close proximity to the indole side chain of a tryptophan and/or do not induce a conformational change that results in alterations in the microenvironments of tryptophan residues of the enzyme upon binding. Nonetheless, we incubated the HCV RNA polymerase with these metal ions, and we intended to monitor the binding of ANS to the enzyme. Unfortunately, high concentrations of  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$  ions (2-20 mM) led to the precipitation of the ANS structural reporter thereby hindering the fluorescence analysis. However, no significant changes in the ANS fluorescence intensity was observed when the enzyme was incubated with lower concentrations (100-1000  $\mu\text{M}$ ) of copper, nickel, and zinc ions (data not shown).

## Discussion

Studies performed with purified proteins in solution add crucial information to crystallographic data. In this regard, the multidimensional properties of both fluorescence and circular dichroism spectroscopy provide accurate sensitivity to monitor numerous aspects of protein-ligand interactions. In the present study, the effect of metal ion binding on the stability of the HCV RNA polymerase was investigated.

The RNA polymerase activity of the HCV NS5B protein has been extensively characterized (7, 13-25). The protein is believed to be responsible for the genome replication of HCV and is thus a critical protein of the virus. Magnesium or manganese ions have been shown to be involved in the catalytic activity of the enzyme (7, 13, 21-25). The novel aspect of the current study is that we demonstrate the structural role of metal ions in the HCV RNA polymerase. Both circular dichroism and fluorescence spectroscopy studies clearly demonstrated that the protein has an increased structural stability in the presence of metal ions, in comparison to the unliganded state. The results are supported by previous observations that demonstrated that the HCV RNA polymerase undergoes conformational changes upon metal ion binding (27, 33). The use of both the ANS structural reporter and acrylamide quencher clearly established structural differences between the unliganded enzyme, and the enzyme bound to magnesium ions. A dual role for metal ions in both structural stabilization and catalysis has also been observed in other proteins (38-41). For instance, the presence of magnesium in the active site of the *Escherichia coli* alkaline phosphatase has been shown to be important for both catalytic activity and stability of the enzyme (38).



What is the biological relevance of the present findings? Mounting evidences suggest that a conformational change is required in order for the HCV RNA polymerase to provide an adequate platform for initiation of transcription/replication. For instance, it has been suggested that a modest movement of a  $\beta$ -hairpin that hang over the active site appears to be necessary in order to position the 3' end of the RNA substrate, and/or accommodate the elongation of the nascent double-stranded RNA molecules (42, 43). This is reminiscent of the situation that is found in the rabbit hemorrhagic disease virus, where it was shown that the conformation of the active site can vary dramatically depending on the ions present during crystallization (44). Comparisons between various RNA polymerases strongly suggest that conformational changes similar to those seen in DNA polymerases may be important for the catalytic activity of RNA polymerases (45, 46). Our study clearly showed that the binding of metal ions induces a conformational change that is characterized by an increased exposure of hydrophobic regions. This conformational modification may reflect movement of flexible structures to accommodate the substrate, or alternatively, it may reflect structural rearrangements that are required for additional functions. For instance, structural modifications may be required to promote interactions with other proteins (47) or to facilitate the formation of the membrane-associated HCV replication complex (48). Alternatively, it has been previously suggested that the  $\Delta I$  loop that connects the fingers and the thumb subdomains of the HCV RNA polymerase could contribute to modulate the conformational state of the enzyme (28). It should be noted that inhibition of such a conformational change may provide a target for the development of novel antiviral drugs. In fact, a recent study suggested that the binding of the HCV NS5A protein to the HCV RNA polymerase may inhibit

conformational changes that are required for the RNA polymerase activity (49). Finally, modulation of the HCV RNA polymerase activity has also been noted upon interaction with the HCV NS3 and NS4B proteins. However, the involvement of precise conformational changes in these processes remains to be addressed.

The present work has demonstrated major changes in the structural stability of the HCV RNA polymerase when it binds to magnesium ions. Our denaturation studies, coupled to polymerization assays, demonstrated that the active site region of the polymerase is more sensitive to chemical denaturant than other structural scaffolds. Indeed, mutational studies have shown that the active site of HCV RNA polymerase is composed of an intricate network of hydrogen bonds and electrostatic interactions, of which a surprisingly high proportion are required for reaction chemistry (9). The amino acids that are coordinating the two metal ions (metal A and B) found in the NS5B active site have also been identified by crystallographic studies (31). The side chains of Asp220 and Asp318 bridge the two metal ions that lie 3.6 Å apart in the crystal structure, whereas the side chain of Asp319 interacts with only one of the two metal ions (metal A) (31). The respective importance of these side chains for catalysis has been confirmed by mutational analysis. While changes to either the Asp220 or Asp318 residues completely abolished the enzymatic activity, substitution of the Asp319 residue by asparagine or glutamate is tolerated (9). In addition to their contacts with aspartate residues, the two metal ions are engaged in a network of interactions with the phosphates of nucleotides (31). For instance, metal B is coordinated by all three phosphates of the nucleotide, while metal A interacts with the  $\alpha$ -phosphate, likely in position to contact the 3' OH of the ultimate nucleotide of the nascent RNA chain during polymerization. The present mutational analysis revealed

the importance of each of the aspartate residues (Asp220, Asp318, and Asp319) that directly contact the metal ions in the previously determined crystal structure of the HCV RNA polymerase. The mutational study underscores a strict requirement for the bidentate interactions made by both Asp220 and Asp318, but the informative finding is that substitution of the Asp319 residue by alanine completely abolished the  $Mg^{2+}$  binding activity. The absence of the Asp319 side chain clearly modifies the geometry of the enzyme active center and completely abrogates the  $Mg^{2+}$  binding activity. This indicates that the active center of the HCV RNA polymerase is intolerant to virtually any perturbations of the metal coordination sphere, highlighting the critical role of the enzyme-bound metal ions.

Based on the results of our fluorescence, circular dichroism, and denaturation experiments, we demonstrated that the NS5B protein undergoes a conformational change upon the binding of metal ions that is characterized by an increased stability of the enzyme. Furthermore, previous reports indicated that the binding of metal ions does not significantly stimulate the binding of the HCV RNA polymerase to its RNA or NTP substrates (27). We thus envisage that the ion-induced conformational change is a prerequisite for catalytic activity by correctly positioning the side chains of residues located in the active site of the enzyme, while at the same time contributing to the stabilization of the enzyme architecture. Therefore, we propose that magnesium ions play a dual modulatory role in the HCV RNA polymerase reaction by promoting both a favourable geometry of the active site for catalysis, and by increasing the structural stability of the enzyme. Although the complete understanding of the mechanisms underlying HCV replication and the cellular and viral factors required for these processes is still incomplete, characterization of the biochemical properties of NS5B should provide the basis for further studies in this direction. Structural and enzymatic studies are clearly

beginning to reveal the essential features of the polymerase reaction. These new insights should eventually lead to the design of effective antiviral drugs to inhibit viral replication and, ultimately, cure infected patients.

## References

1. Sarbah, S., and Younossi, Z. (2000) *J. Clin. Gastro.* **30**, 125-143
2. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989) *Science* **244**, 359-362
3. Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q. L., Houghton, M., and Kuo, G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6547-6549
4. Alter, H. J. (1995) *Blood* **85**, 1681-1695
5. Houghton, M. (1996) *Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA
6. Al, R. H., Xie, Y., Wang, Y., and Hagedorn, C. H. (1998) *Virus Res.* **53**, 141-149
7. Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996) *EMBO J.* **15**, 12-22
8. De Francesco, R., Behrens, S. E., Tomei, L., Altamura, S., and Jiricny, J. (1996) *Methods Enzymol.* **275**, 58-67
9. Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., and Bartenschlager, R. (1997) *J. Virol.* **71**, 8416-8428
10. Yuan, Z. H., Kumar, U., Thomas, H. C., Wen, Y. M., and Monjardino, J. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **232**, 231-235
11. Oh, J. W., Sheu, G. T., and Lai, M. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17710-17717
12. Miller, R. H., and Purcell, R. H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2057-2061
13. Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J. W., Baroudy, B. M., Lau, J. Y., and Hong, Z. (1999) *J. Virol.* **73**, 1649-1654

14. Lohmann, V., Roos, A., Korner, F., Koch, J. O., and Bartenschlager R. (2000) *J. Viral Hepatitis* **7**, 167-174
15. Cheney, I. W., Naim, S., Lai, V. C. H., Dempsey, S., Bellows, D., Walker, M. P., Shim, J. H., Horscroft, N., Hong, Z., and Zhong, W. (2002) *Virology* **297**, 298-306
16. Kao, C. C., Yang, X., Kline, A., Wang, Q. M., Barket, D., and Heinz, B. A. (2000) *J. Virol.* **74**, 11121-11128
17. Oh, J. W., Ito, T., and Lai, M. M. C. (1999) *J. Virol.* **73**, 7694-7702
18. Carroll, S. S., Sardana, V., Yang, Z., Jacobs, A. R., Mizenko, C., Hall, D., Hill, L., Zugay-Murphy, J., and Kuo, L. C. (2000) *Biochemistry* **39**, 8243-8249
19. Sun, X. L., Johnson, R. B., Hockman, M. A., and Wang, Q. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **268**, 798-803
20. Uchiyama, Y., Huang, Y., Kanamori, H., Uchida, M., Doi, T., Takamizawa, A., Hamakubo, T., and Kodama, T. (2002) *Hepatology Res.* **23**, 90-97
21. Tomei, L., Vitale R. L., Iccitti, I., Serafini, S., Altamura, S., Vitelli, A., and De Francesco, R. (2002) *J. Gen. Virol.* **81**, 759-767
22. Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y. N., and Hong, Z. (2000) *J. Virol.* **74**, 2017-2022
23. Yamashita, T., Kaneko, S., Shiota, Y., Qin, W., Nomura, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15479-15486
24. Luo, G., Hamatake, R. K., Mathis, D. M., Racela, J., Rigat, K. L., Lemm, J., and Colonno, R. J. (2000) *J. Virol.* **74**, 851-863
25. Johnson, R. B., Sun, X. L., Hockman, M. A., Villarreal, E. C., Wakulchik, M., and Wang, Q. M. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 129-134

26. Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C. A., Maag, D., Ghosh, S. K. B., Cameron, C. E., Lau, J. Y. N., and Hong, Z. (2000) *J. Virol.* **74**, 9134-9143
27. Bougie, I., Charpentier, S., and Bisaillon, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 3868-3875
28. Bressanelli, S., Tomei, L., Roussel, A., Incitti, I., Vitale, R. L., Mathieu, M., De Francesco, R., and Rey, F. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13034-13039
29. Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C. (1999) *Nature Struc. Biol.* **6**, 937-943
30. Brautigam, C. A., and Steitz, T. A. (1998) *J. Mol. Biol.* **277**, 363-377
31. Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A., and De Francesco, R. (2002) *J. Virol.* **76**, 3482-3492
32. Beese, L. S., and Steitz, T. A. (1991) *EMBO J.* **10**, 25-33
33. Ranjith-Kumar, C. T., Kim, Y. C., Gutshall, L., Silverman, C., Khandekar, S., Sarisky, R. T., and Kao, C. C. (2002) *J. Virol.* **76**, 12513-12525
34. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**, 51-59
35. Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1981) *Anal. Biochem.* **114**, 199-227
36. Labowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> Ed., pp.237-266, Kluwer/Plenum, New York
37. Calhoun, D. B., Vanderkooi, J. M., and Englander, S. W. (1983) *Biochemistry* **22**, 1533-1539
38. Janeway, C. M. L., Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A., and Kantrowitz, E. R. (1993) *Biochemistry* **32**, 1601-1609
39. Hung, H. C., and Chang, G. G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 34-45

40. Scolnick, L. R., Kanyo, Z. F., Cavalli, R. C., Ash, D. E., and Christianson, D. W. (1997) *Biochemistry* **36**, 10558-10565
41. Matulis, D., and Lovrien, R. (1998) *Biophys. J.* **74**, 422-429
42. Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., and Stuart, D. I. (2001) *Nature* **410**, 235-240
43. Hong, Z., Cameron, C. E., Walker, M. P., Castro, C., Yao, N., Lau, J. Y., and Zhong, W. (2001) *Virology* **285**, 6-11
44. Ng, K. K. S., Cherney, M. M., Vazquez, A. L., Machin, A., Alonso, J. M. M., Parra, F., and James, M. N. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1381-1387
45. Doublié, S., Sawaya, M. R., and Ellenberger, T. (1999) *Structure* **7**, R31-R35
46. Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L., and Harrison, S. C. (1998) *Science* **282**, 1669-1675
47. Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M. P., and Schuster, C. (2003) *J. Virol.* **77**, 5401-5414
48. Moradpour, D., Gosert, R., Egger, D., Penin, F., Blum, H. E., and Bienz, K. (2003) *Antiviral Res.* **60**, 103-109
49. Shirota, Y., Luo, H., Qin, Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11149-11155



## **Acknowledgments**

We thank Dr. Pierre Lavigne for his generosity and expert assistance with CD spectroscopy measurements. This work was supported by grants from both the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M.B. is a New Investigator Scholar from the CIHR.

## Figure legends

**Fig. 1. Expression, purification, and fluorescence properties of the HCV RNA polymerase.** (A) An aliquot (2  $\mu$ g) of the purified preparation of the NS5B protein was analyzed by electrophoresis through a 12.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS and visualized by staining with Coomassie Blue Dye (lane 2). The positions and sizes (in kDa) of the size markers (lane 1) are indicated on the left. (B) Background corrected fluorescence emission spectra of NS5B. 1, Purified protein in 50 mM Tris-HCl, and 50 mM KOAc, pH 7.5; 2, Purified protein after a 2-hour exposure to an 8 M solution of urea at 25°C. Fluorescence spectra were recorded at an excitation wavelength of 290 nm. The molar fluorescence of NS5B is shown in inset. Various concentrations of the purified NS5B protein were assayed in 50 mM Tris-HCl, and 50 mM KOAc, pH 7.5. Emission was monitored at 335 nm and excitation was performed at 290 nm.

**Fig. 2. Guanidium hydrochloride-induced unfolding equilibrium of the NS5B protein.** (A) Transition curves for GdmHCl-induced unfolding of NS5B (■) in the presence of 50 mM of  $Mg^{2+}$  (□), were determined. Equilibrium unfolding transitions were monitored by integration of the fluorescence intensity. (B) Effect of Gdm-HCl denaturation on the catalytic activity of NS5B. The HCV RNA polymerase was preincubated in the absence (■) or presence (□) of 20 mM  $MgCl_2$ , and denatured with increasing concentrations of Gdm-HCl. The standard RNA polymerase reaction (50  $\mu$ l) was performed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM DTT, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 U of RNAGuard (Amersham Biosciences), 50 mM NaCl, with 0.2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -32]UTP, 10  $\mu$ g/ml polyA/oligodT, and 1 mM cold UTP. The reactions were incubated at 18 °C for

2 hours, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The precipitable radioactivity was quantitated by liquid scintillation counting.

**Fig. 3. Thermal denaturation of HCV RNA polymerase.** (A) Thermal denaturation was recorded for the NS5B protein in both the absence (1) and presence (2) of 20 mM  $\text{MgCl}_2$ . The spectra were recorded from 20 to 90 °C at a protein concentration of 20  $\mu\text{M}$ . (B) Effect of thermal denaturation on the catalytic activity of NS5B. The HCV RNA polymerase was preincubated in the absence (■) or presence (□) of 20 mM  $\text{MgCl}_2$ . Aliquots were preincubated for 15 min at various temperatures and then quenched on ice. Control aliquots were kept on ice throughout the pre-treatment. The standard RNA polymerase reaction (50  $\mu\text{l}$ ) was performed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 U of RNAGuard (Amersham Biosciences), 50 mM NaCl, with 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ -32]UTP, 10  $\mu\text{g/ml}$  polyA/oligodT, and 1 mM cold UTP. The reactions were incubated at 18 °C for 2 hours, followed by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The precipitable radioactivity was quantitated by liquid scintillation counting.

**Fig. 4. Thermodynamic parameters of the interaction between  $\text{Mg}^{2+}$  ions and the NS5B protein.** Fluorescence spectroscopy was used to monitor the binding of magnesium ions to the HCV RNA polymerase at various temperatures. A van't Hoff plot for the interaction between  $\text{Mg}^{2+}$  ions and the enzyme is shown. The effect of temperature on the association constant was evaluated at pH 7.0.

**Fig. 5. Binding of ANS to the HCV RNA polymerase during urea denaturation.** The NS5B protein was incubated in the absence (■) or presence (□) of 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , and unfolded with various concentrations of urea at 22 °C for 1 hour. Fluorescence

emission was monitored after ANS addition (50  $\mu$ M) at an excitation wavelength of 380 nm. The integrated fluorescence area between 400 and 600 nm was evaluated.

**Fig. 6. Stern-Volmer plots for the quenching of the intrinsic fluorescence of the NS5B protein by acrylamide.** The NS5B protein was incubated in the absence (■) or presence (□) of 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , and denatured with 0 M (A) or 4.5 M urea (B) at 22 °C for 1 hour. The denatured enzyme was then titrated with various amounts of acrylamide. Excitation was set at 290 nm, and the emission of the fluorescence-integrated area between 320 and 370 nm was determined.

**Fig. 7. Characterization of the HCV RNA polymerase alanine mutants.** (A) Fluorescence spectroscopy assays were performed by incubating the wild-type (■), and D220A (□), D318A ( $\Delta$ ), and D319A (O) mutants (250 nM) with increasing amounts of  $\text{MgCl}_2$ . Excitation was performed at 290 nm, and emission was monitored from 310 to 440 nm. The saturation isotherms were generated by plotting the change in the fluorescence intensity at 335 nm as a function of added  $\text{MgCl}_2$ . (B) Transition curves for GdmHCl-induced unfolding of the unliganded D220A mutant (□), and the mutant in the presence of 50 mM of  $\text{MgCl}_2$  ( $\nabla$ ), were determined. Equilibrium unfolding transitions were monitored by integration of the fluorescence intensity. (C) The D220A mutant was incubated in the absence (□) or presence ( $\nabla$ ) of 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , and unfolded with various concentrations of urea at 22 °C for 1 hour. Fluorescence emission was monitored after ANS addition (50  $\mu$ M) at an excitation wavelength of 380 nm. The integrated fluorescence area between 400 and 600 nm was evaluated.

Table I

*Thermodynamic unfolding parameters measured by equilibrium guanidium hydrochloride denaturation*

Protein	$C_m$ (M)	$\Delta C_m$ (M)	$m$ (kJ·mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{D_u}^\circ$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{D_u}^\circ$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
NS5B	1.05	0.00	2.84	5.59	0.00
NS5B·Mg	1.91	0.86	3.25	7.81	2.22

The parameters  $\Delta G_{D_u}^\circ$  (Gibbs free energy of unfolding in the absence of denaturant),  $m$  (cooperativity of unfolding), and  $C_m$  (midpoint concentration of denaturant required to unfold half of the protein) were determined by guanidium hydrochloride denaturation and from the integration of the fluorescence intensity. The differences in  $C_m$  and  $\Delta G_{D_u}^\circ$  values in comparison to the free NS5B protein are also shown ( $\Delta C_m$  and  $\Delta\Delta G_{D_u}^\circ$ , respectively).

Table II

*Quenching of the HCV RNA polymerase intrinsic fluorescence by acrylamide*

Urea Concentration	$V$		$K_{sv}$	
	-Mg <sup>2+</sup>	+Mg <sup>2+</sup>	-Mg <sup>2+</sup>	+Mg <sup>2+</sup>
(M)	(M <sup>-1</sup> )		(M <sup>-1</sup> )	
0	1.019	0.982	1.025	1.057
1.0	1.021	1.021	0.934	1.365
2.0	1.027	0.978	2.368	1.289
4.5	1.025	1.073	1.820	0.396
6.0	0.995	1.061	1.104	0.415

Fluorescence spectroscopy assays were performed to evaluate both the dynamic Stern-Volmer quenching constant ( $K_{sv}$ ) and the static quenching constant ( $V$ ). The quenching experiments were performed both in the absence (-Mg<sup>2+</sup>) or in the presence (+Mg<sup>2+</sup>) of 10 mM Mg<sup>2+</sup>.

Figure 1

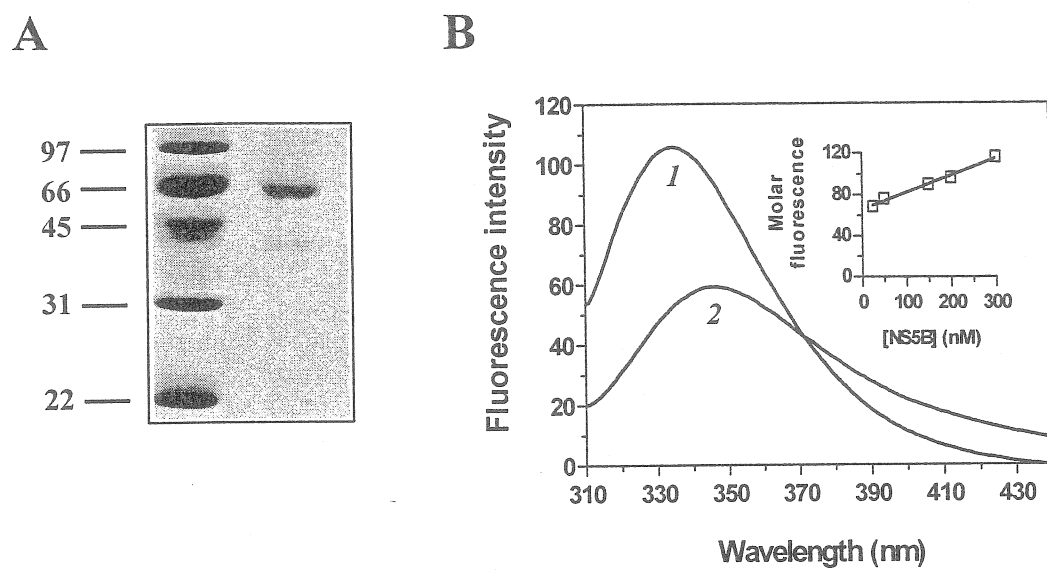


Figure 2

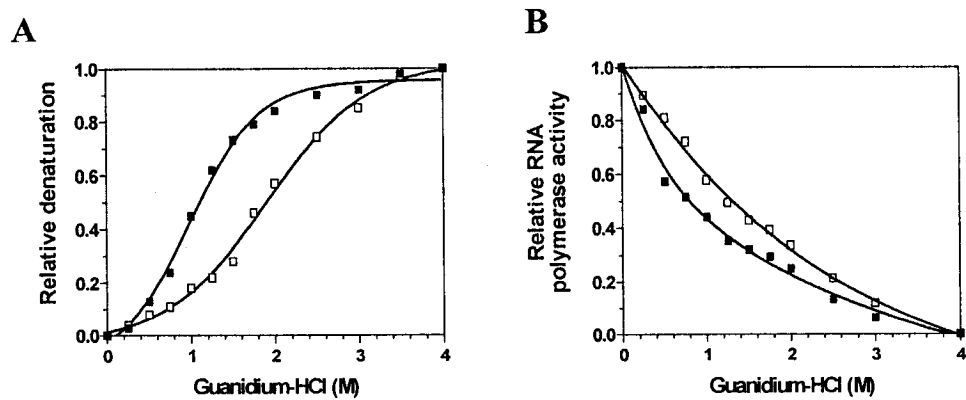




Figure 3

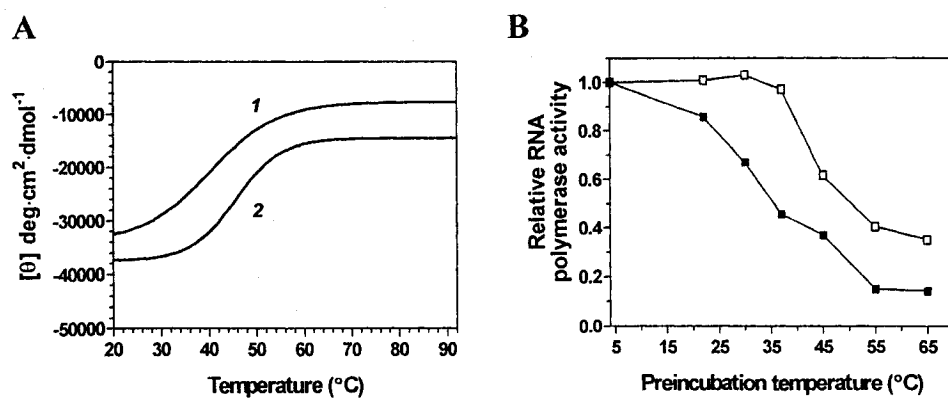


Figure 4

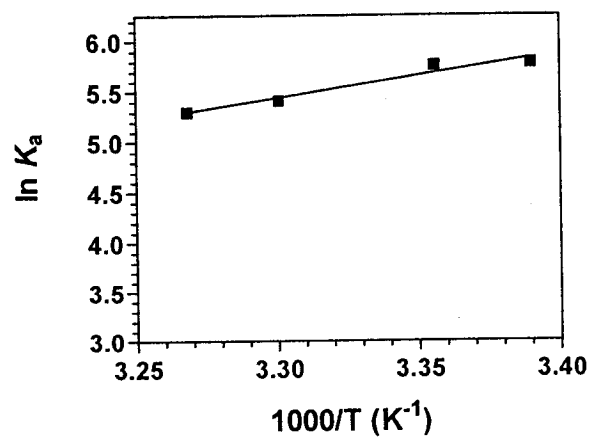


Figure 5

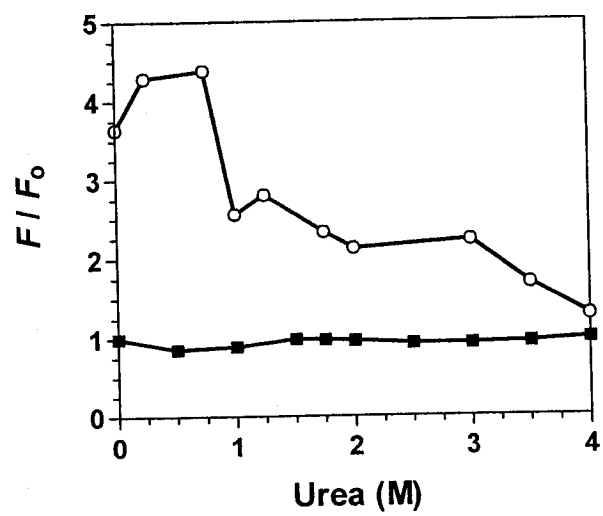


Figure 6

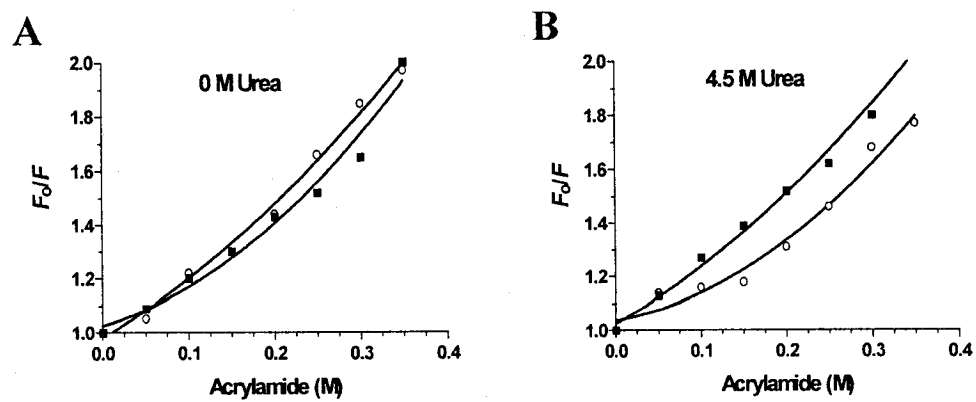
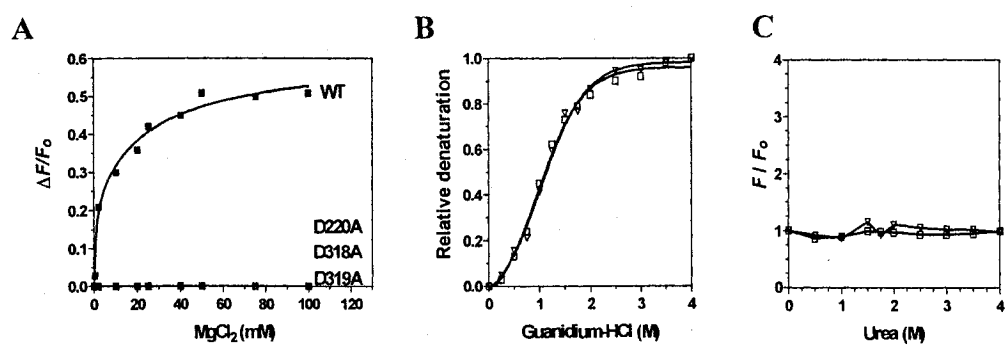


Figure 7



## DISCUSSION

Cette partie du mémoire portera principalement sur les perspectives concernant les travaux déjà effectués, à l'issu des résultats obtenus et présentés dans les articles intégrés aux mémoires. Quelques résultats préliminaires, sur lesquels reposent certaines perspectives sont également présentés dans cette section.

### 1. Détermination de l'énergie de liaison de l'ARN-triphosphatase du virus du Nil occidental à l'ARN

#### 1.1 Caractérisation de l'activité ATPase/hélicase de la protéine NS3

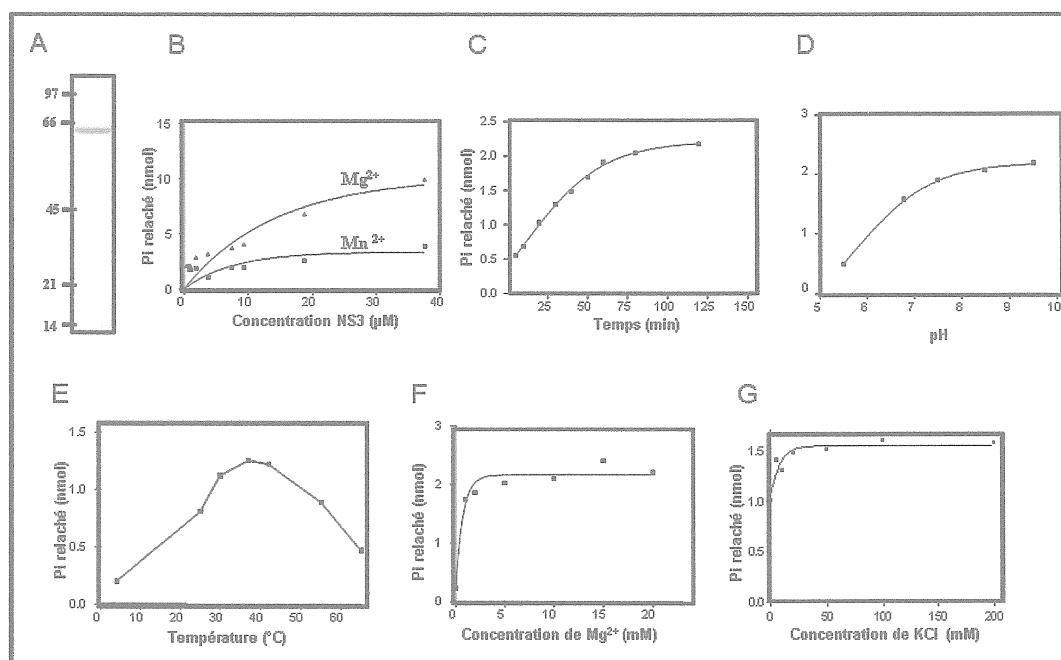
La première étude de la protéine NS3 a principalement porté sur la caractérisation de l'activité ARN-triphosphatase de la protéine qui est impliquée dans la synthèse de la structure coiffée. Cette étude a abouti en la caractérisation des paramètres cinétiques et des conditions optimales de l'activité ARN-triphosphatase ainsi que de la caractérisation de la liaison de la protéine NS3 à son substrat ARN. La caractérisation d'une interaction ARN-protéine d'une protéine impliquée dans la synthèse de la structure coiffée constitue un point très avantageux. Cela permet une meilleure compréhension du rôle de l'enzyme et définir ses affinités avec ses substrats. De plus, l'étude du changement de conformation de la protéine suite à la liaison de la protéine NS3 est cruciale à la compréhension du mécanisme catalytique de l'enzyme qui adopte une nouvelle conformation active suite à la liaison de son substrat l'ARN. Cet aspect de l'enzyme n'est pas comparable à celui des ARN-triphosphatases de levures caractérisées auparavant qui, contrairement à NS3 requiert des ions divalents pour adopter une conformation tridimensionnel active (HO *et al.*, 1998 ; LIMA *et al.*, 1999).

Nous avons également démontré que le tripolyphosphate inhibe de manière efficace l'activité ARN-triphosphatase et montre plus d'affinité à la protéine NS3 que le substrat lui-même. Donc, cette molécule pourrait servir comme modèle potentiel pour développer des agents antiviraux. De même, il a été démontré dans des études précédentes que le tripolyphosphate pouvait inhiber l'activité de l'ARN-triphosphatase de *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma brucei* et *Chlorella virus* (PEI *et al.*, 2001 ; GONG et SHUMAN, 2002). Toutefois, selon la séquence d'acides aminés (DEAH) correspondant au motif Walker, la protéine NS3 supporte d'autres activités possiblement impliquées dans la réplication du virus dans la cellule hôte. Ces activités sont les activités ATPase/hélicase (DUMONT *et al.*, 2006). En effet, ces activités sont principalement responsables du déroulement des structures secondaires du génome viral afin de faciliter l'activité de la polymérase virale ainsi la traduction par la machinerie de la cellule hôte.

Pour la plupart des hélicases incluant un motif Walker dans leur séquence, l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour fournir de l'énergie à la protéine qui lui permettra de transloquer tout au long du génome viral (GALLIVAN et MC GARVEY, 2003). D'ailleurs dans le cadre de la caractérisation de quelques protéines virales, il a été déjà démontré que la protéine recombinante  $\lambda 1$  du réovirus supporte les activités NTPase/hélicase et ARN-triphosphatase en impliquant le même site catalytique (BISAILLON et LEMAY, 1997). De ce fait, une des principales perspectives serait de caractériser l'activité ATPase/hélicase, sachant que la protéine NS3 supporte déjà une activité ARN-triphosphatase qui est très importante dans la synthèse de la structure coiffée. De ce fait, la présente section propose quelques résultats préliminaires qui ont été obtenus dans le but de caractériser ces activités.

Comme cela a été décrit dans l'article montrant les résultats de la détermination de l'énergie de la liaison de l'ARN-triphosphatase du virus du Nil occidental à l'ARN (ARTICLE 1), la protéine NS3 recombinante a été exprimée et purifiée selon les techniques préalablement illustrées. L'activité ATPase a été déterminée avec la même technique utilisée pour la caractérisation de l'activité ARN-triphosphatase c'est-à-dire par dosage du phosphate inorganique relâché du substrat  $[[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}]$ , qui a migré par capillarité sur plaque de chromatographie sur couche mince.





**Figure 1. Caractérisation de l'activité ATPase de la protéine NS3.**

Expression et purification de la protéine NS3 recombinante du virus du Nil occidental. (A) Un échantillon de la protéine NS3 (2μg) purifiée est analysé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 12% contenant 0.1% SDS et visualisé par la coloration au Bleu de Coomassie. La taille de la protéine correspond à 53-kDa selon le marqueur de taille. (B) Le substrat utilisé pour la détermination de l'activité ATPase est l'ATP radiomarqué en phosphate  $\gamma$  incubé en présence de concentrations croissantes de la protéine NS3 dans un tampon contenant 50mM de Tris-HCl, pH 7.5 et 5mM DTT pendant 60 minutes à 37°C en présence de 5mM de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ . La réaction est arrêtée par l'ajout de 2μl d'acide formique 5M. Un échantillon de la réaction est déposé sur une plaque de TLC de polyéthylèneimine-cellulose et migre grâce à un tampon d'acide formique (1M), LiCl (0,5M). Le Pi relâché est quantifié à partir de la plaque de TLC par le phosphorimager. (C) Détermination de l'activité ATPase de la protéine NS3 en fonction du temps. (D) L'activité ATPase a été déterminée à différent pH de la réaction. (E) L'effet de la température sur l'activité ATPase a été aussi déterminé. (F) Une courbe de Pi relâché en fonction de concentration croissante de  $Mg^{2+}$  a été établie. (G) Une vérification de l'activité ATPase en augmentant la force ionique dans le milieu réactif, et ce en ajoutant différentes concentrations de KCl, a été effectué.

Les résultats obtenus indiquent que, contrairement à l'activité ARN-triphosphatase supportée par la protéine NS3, l'activité ATPase nécessite la présence d'ions divalents (Figure 1A). De plus, on remarque clairement que cette activité montre une préférence à l'ion  $Mg^{2+}$  comparativement à l'ion  $Mn^{2+}$ . Il est à noter aussi que les mêmes tests ont été réalisés en présence d'autres ions divalents ( $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , etc..) qui montrent plutôt un effet inhibiteur sur l'activité ATPase. Ces mêmes résultats ont été observés dans le cadre de la caractérisation *in vitro* de la protéine NS3 du virus de l'hépatite C (KYONO *et al.*, 2003). Ensuite, les conditions optimales de l'activité ATPase ont été déterminées. On remarque que l'activité ATPase atteint un maximum de phosphate inorganique relâché après 60 min d'incubation en présence de quantités saturantes de substrat (Figure 1B). De plus, l'activité optimale de l'activité ATPase est repérée à une température de 37°C (Figure 1E). La même observation a été notée dans le cadre de la caractérisation de l'activité ARN-triphosphatase (BENZAGHOU *et al.*, 2006). La détermination du pH optimal de l'activité ATPase a été établie, et cela a permis de conclure que l'activité devient optimale à partir d'un pH 7,5 et montre que cette activité est assurée même à des pH alcalins (pH 8,5 et pH 9,5) (Figure 1D). Ces résultats n'ont pas été observés lors de la détermination du pH optimal de l'activité ARN-triphosphatase. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'augmentation du pH pourrait induire la déprotonation des résidus, ayant une charge positive, impliqués dans la liaison à l'ARN qui est chargé négativement. Ces résidus devenant moins positifs, à un pH alcalin, pourraient affecter la liaison à l'ARN. En revanche, ces acides aminés ne semblent pas intervenir dans la liaison à l'ATP parce que l'activité ATPase n'est pas affectée par l'augmentation du pH. Malgré le fait que la majorité des enzymes montrent une activité optimale seulement à des pH physiologiques et notamment la protéine NS3 du virus de l'hépatite C (KYONO *et al.*, 2003), l'hydrolyse des phosphates à un pH

alcalin en faisant intervenir des ions divalents a été déjà observée chez la phosphatase alcaline de *Echerichia coli* et ceci peut suggérer que l'hydrolyse du phosphate se fait par le même mécanisme catalytique que celui de la phosphatase alcaline de *Echerichia coli* (GAREN et LEVINTHAL, 1960).

Par ailleurs, nous avons pu observé que l'activité ATPase n'est pas affectée ni par l'augmentation de la concentration de  $Mg^{2+}$  ni par l'augmentation de la force ionique (Figure 1 F, G). Ceci appuie l'hypothèse dressée dans l'article (ARTICLE 1) qui stipule que le  $Mg^{2+}$  change probablement le positionnement des résidus du site catalytique pour leur donner une géométrie favorable à l'activité catalytique ATPase. Cette géométrie est probablement adoptée par la protéine dans le cas de l'activité de l'ARN-triphosphatase par l'important changement conformationnel induit par la liaison à l'ARN (BENZAGHOU *et al.*, 2006). Ceci signifierait aussi que le changement de structure tertiaire de la protéine détectée par dichroïsme circulaire, suite à la liaison à l'ARN, induit un repositionnement des résidus impliqués dans le site catalytique compensé par la liaison au  $Mg^{2+}$  dans le cas de l'activité ATPase. D'une manière générale, les ions divalents ont souvent un rôle crucial dans l'activation de l'attaque nucléophile nécessaire à la catalyse, dans la stabilisation des étapes de transition ainsi que dans l'augmentation de la stabilité de la protéine. Mis à part ces rôles, ils peuvent aussi définir la fonction de l'enzyme. La protéine qui peut illustrer cet exemple est l'ARN-triphosphatase de *S.cerevisiae*. Elle assure une activité ARN-triphosphatase en liant l'ion magnésium, alors qu'en liant le manganèse elle hydrolyse les nucléotides (Ho *et al.*, 1998). Cette détermination de la fonction catalytique par l'ion magnésium est observée chez la protéine NS3. Cela suggère aussi que les ions procurent une nouvelle

géométrie au site catalytique de l'enzyme, donc une nouvelle fonction. Le mécanisme exact de ce changement d'activité de l'enzyme par les ions reste encore à élucider.

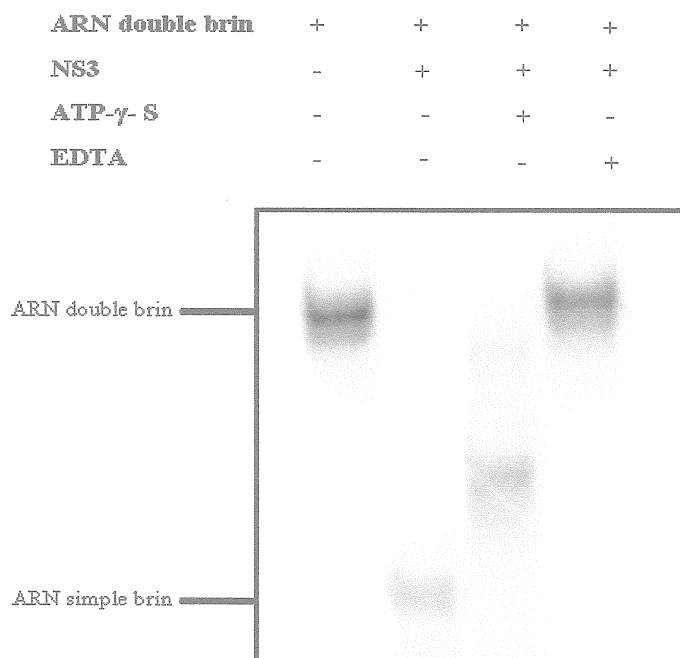
D'autres part, des paramètres cinétiques, de l'activité ATPase de la protéine NS3, ont été déterminés (Tableau I). La constante d'affinité de Michael-Menten ( $k_M$ ) de la protéine NS3 à l'ATP a été estimée à 176  $\mu\text{M}$ . Ce résultat se situe dans le même ordre de valeur des constantes d'affinité déjà déterminés d'ATPase/helicase de *Flavivirus* et notamment la protéine NS3 du virus de l'hépatite C qui montre un  $k_M$  de 151  $\mu\text{M}$  (KYONO et al., 2003). En outre, les constantes cinétiques de la protéine en présence d'autres nucléotides ont été déterminées. On remarque que la protéine NS3 montre une meilleure affinité pour les pyrimidines que les purines. Cependant le nucléotide le plus efficacement catalysé reste l'ATP. Finalement, les valeurs des constantes obtenues permettent de conclure que le meilleur substrat de la protéine est l'ARN (Tableau I). Ces résultats indiquent aussi que la protéine NS3 a la capacité d'hydrolyser tous les nucléotides et même les désoxyribonucléotiques.

**Tableau I :**  
**Détermination des constantes d'affinité ( $K_m$ ),  $K_{cat}$  et des constantes de spécificités à l'ARN et aux nucléotides.**

	$K_m$ ( $\mu M$ )	$K_{cat}$ $min^{-1}$	$K_{cat}/K_m$
ARN	3	0.39	0.13
ATP	176	1.12	$6.80 \cdot 10^{-3}$
CTP	48	0.072	$1.5 \cdot 10^{-3}$
GTP	114.75	0.72	$6.2 \cdot 10^{-3}$
UTP	52.68	0.0434	$8.2 \cdot 10^{-4}$
dATP	108	0.0175	$1.6 \cdot 10^{-4}$

Les constantes ont été déterminées selon la méthode en de Michaelis-Menten et Lineweaver-Burck

L'autre volet de la caractérisation de la protéine NS3 consiste à la détermination des propriétés de l'activité hélicase impliquée dans la réplication, la traduction et l'encapsidation de l'ARN viral. Pour caractériser cette activité, nous avons utilisé un substrat ARN double-brin ayant un brin radiomarké. Le premier brin de l'ARN a été synthétisé à partir d'un plasmide pBluescript II KS et digéré par Bam HI. La transcription de l'ARN a été effectuée par l'ARN T7 polymérase en présence de nucléotides et de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ - GTP. L'ARN radiomarké est hybridé à un ARN froid pour obtenir le type de substrat voulu.



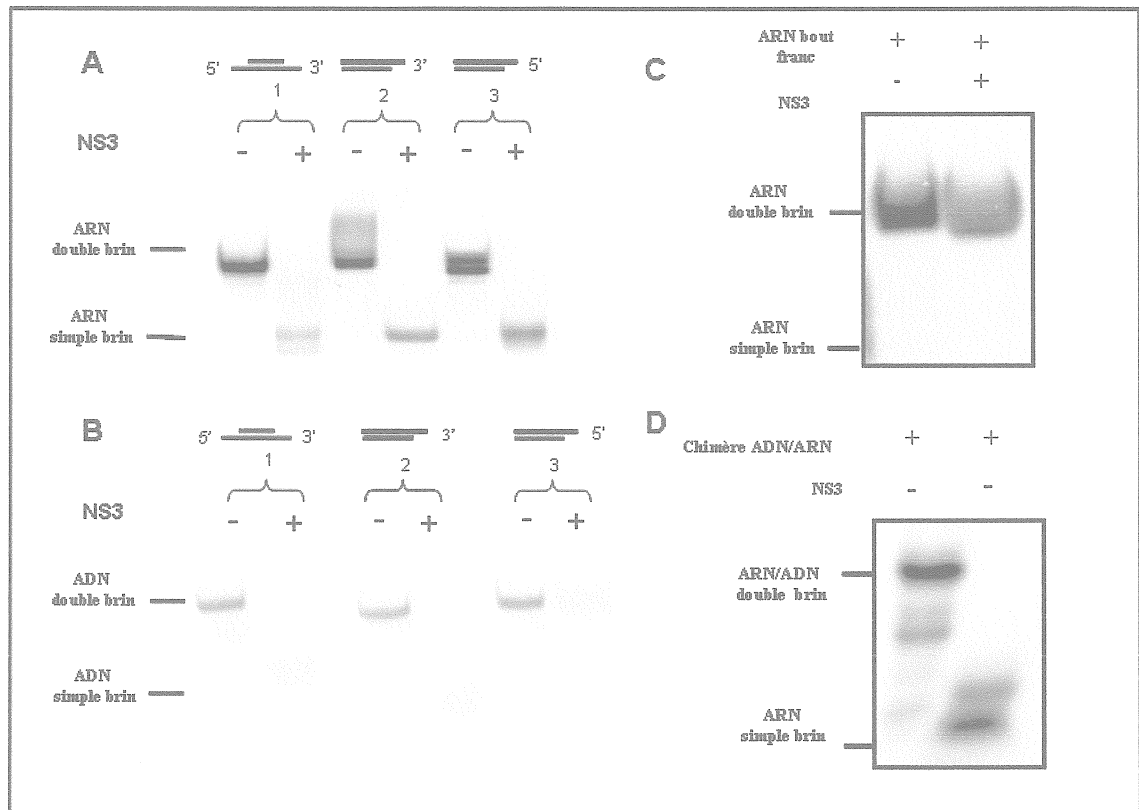
**Figure.2 : Test de l'activité hélicase.**

La réaction contient du Tris-HCl 50mM et 5mM DTT. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 15% non dénaturant. Le substrat utilisé est l'ARN double brin ayant un brin radiomarké de 20nt hybridé avec un brin de 50nt, ayant des extrémités 5' et 3' saillantes. Dans le 1<sup>er</sup> puit l'ARN double brin est déposé en absence de protéine. Dans le deuxième puit le substrat est incubé avec la protéine NS3 (48 $\mu$ M). Dans le 3<sup>ième</sup> puit, de l'ATP- $\gamma$ -S (1mM) a été ajouté à la réaction contenant de l'ARN double brin et la protéine NS3. Dans le 4<sup>ième</sup> puit 5mM d'EDTA a été ajouté à la réaction contenant le substrat ainsi que la protéine NS3.

En premier lieu, les résultats obtenus mettent en évidence la nécessité de l'hydrolyse de l'ATP pour que la protéine NS3 puisse accomplir son activité hélicase. On remarque que la protéine assure une activité hélicase intrinsèque due à une présence résiduelle d'ions divalents et de nucléotides persistants aux étapes de purification. En effet, cette observation a été confirmée par l'ajout de l'ATP- $\gamma$ -S qui a compétitionné avec les nucléotides résiduels et l'ajout de l'EDTA pour chélater les ions et empêcher l'hydrolyse des nucléotides et donc le déroulement de l'ARN par la protéine (Figure 2).

En second lieu, nous nous sommes intéressés à la polarité de l'activité hélicase en utilisant un substrat ARN. Les résultats démontrent que la protéine NS3 a la capacité de dérouler l'ARN double brin des extrémités 3'→ 5' et 5'→ 3' (Figure 3). Ces résultats sont en contraste avec les constatations faites sur les autres hélicases des *Flavivirus* déjà caractérisés. Ces hélicases montrent une polarité unique, et déroulent seulement l'ARN double brin qu'à partir de l'extrémité 3'→ 5' (TAI *et al.*, 1996). Malgré la grande similarité structurale des hélicases des *Flavivirus* avec la protéine NS3 du virus du Nil occidental, évaluée par un programme informatique DeepView, ne montre pas les mêmes propriétés au niveau de la polarité. Ceci pourrait être dû aux quelques différences au niveau de la structure primaires des protéines. D'ailleurs, en comparant les propriétés enzymatiques de NS3 des différentes souches du virus de l'hépatite C, des variations très significatives peuvent être observées (LAM *et al.*, 2003). Ensuite on s'est intéressé à la caractérisation de l'activité hélicase en présence de substrat d'ADN double brin. Et étonnamment, en présence de substrat ADN la protéine NS3 montre de la difficulté à dérouler l'ADN double brins ayant une extrémité saillante en 5', ce qui rejoint les observations faites sur la polarités des hélicases des *Flavivirus*, en occurrence, les hélicases de certaines souches du virus de l'hépatite C (Figure 3) (TAI *et al.*, 1996).

Par ailleurs, ces observations nous ont mené à l'évaluation de la capacité de la protéine NS3 à dérouler l'ARN à partir des bouts francs. Les données obtenues démontrent que la protéine n'a pas la capacité de dérouler l'ARN ayant des bouts francs mais déroule bel et bien des deux extrémités saillantes de l'ARN. De plus, nous avons démontré que la protéine a la capacité aussi de dérouler un substrat chimère ARN/ADN (Figure 3). Ceci a été aussi observé avec NS3 du virus de l'hépatite C.



**Figure 3. Détermination de la spécificité de l'activité hélicase au substrat et polarité.**

La réaction contient du Tris-HCl 50mM, 5mM DTT, 100 $\mu$ M ATP et 5mM Mg<sup>2+</sup>. Les produits des réactions ont été analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 15% non dénaturant. Le substrat utilisé est l'ARN ou ADN double brin ayant un brin radiomarqué de 20nt hybridé avec un brin de 50nt. Différents substrats ont été incubés avec la protéine NS3 (48 $\mu$ M) pendant 60 min à 37°C. **(A)** Détermination de l'activité hélicase de la protéine NS3 en présence de substrat ARN double brin ayant des extrémité 3'et 5' saillantes (1<sup>er</sup> essai), en présence d'ARN double brin avec une extrémité 3' saillante (2<sup>ème</sup> essai) et un substrat avec une extrémité 5' saillantes (3<sup>ème</sup> essai). **(B)** La même expérience que la précédente a été effectuée en présence d'un substrat ADN double brin. **(C)** Détermination de l'activité hélicase en présence d'un substrat ARN à bouts francs de 20 nt. **(D)** La protéine NS3 a été incubé en présence d'un substrat chimère, un brin d'ARN radiomarqué de 20nt a été hybridé à un brin d'ADN de 50 nt, les extrémités 5' et 3' sont saillantes.



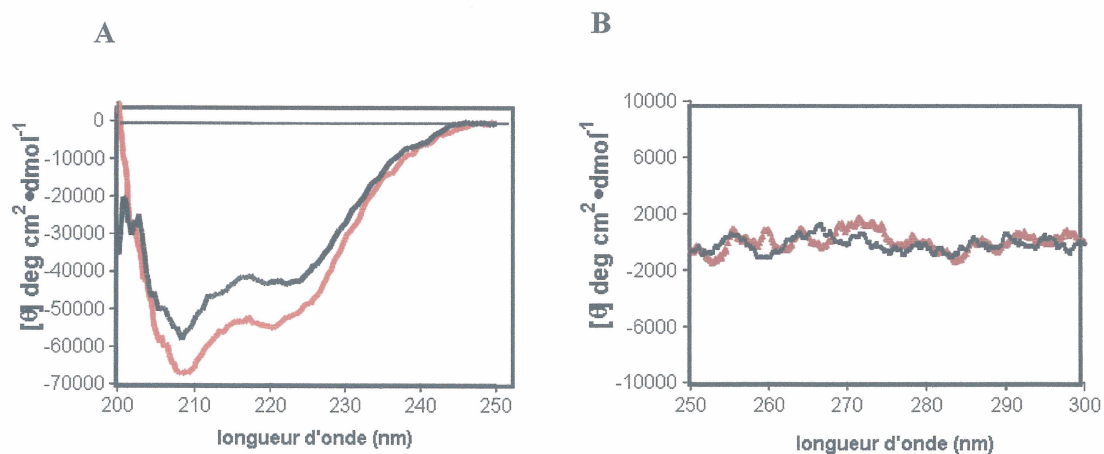
Enfin des tests de procéssivité ont été effectués et ont permis de conclure que l'activité hélicase de la protéine NS3 montre une grande procéssivité en ayant une capacité de dérouler même des substrats contenant des régions de 90nt hybridés. Cette grande procéssivité de l'activité hélicase ainsi que sa capacité de dérouler l'ARN des deux extrémités 3'→ 5' et 5'→ 3' suggèrent que la protéine NS3 est impliquée dans plusieurs étapes de la réplication du virus. En premier lieu, elle serait impliquée dans le déroulement des structures secondaires pour faciliter l'activité de la polymérase qui utilise l'ARN viral comme matrice. En second lieu, elle jouerait un rôle dans l'encapsidation en séparant l'ARN génomique du brin nouvellement synthétisé, et ainsi faciliter la formation du virion. Enfin elle pourrait être impliquée dans la traduction de l'ARN viral en rendant plus accessible l'ARN à la machinerie cellulaire de traduction.

L'étude proposée nous renseigne sur l'importance de la protéine NS3 dans la réplication du virus dans la cellule hôte par les nombreuses activités qu'elle supporte, que cela soit par son implication majeure dans la synthèse de la structure coiffe, ou bien par son implication dans le déroulement de l'ARN viral pour faciliter plusieurs étapes de la réplication, la traduction et l'encapsidation.

## **1.2 Changement de la conformation de la protéine NS3 suite à la liaison au $Mg^{2+}$ et stabilité**

Dans la présente étude, nous avons démontré que contrairement à l'activité ARN-triphosphatase qui est inhibée par les ions métalliques, l'activité ATPase de la protéine NS3 est supportée par les ions et particulièrement le  $Mg^{2+}$ . Cette particularité

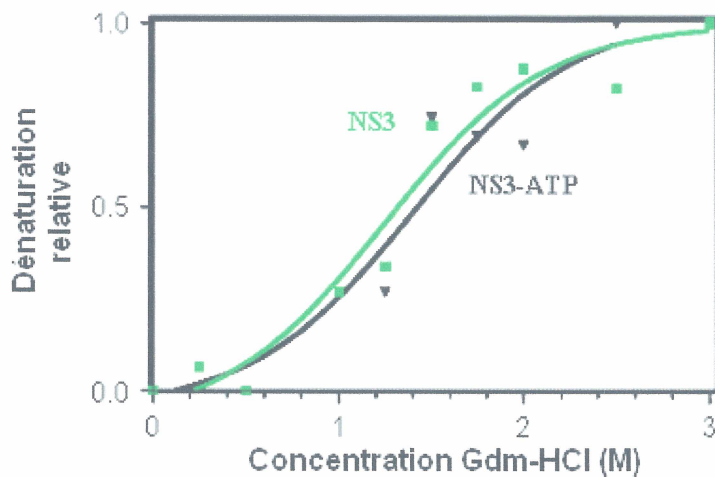
n'a pas été observé chez la protéine NS3 du virus de l'hépatite C car elle n'assure pas une activité ARN-triphosphatase impliquée dans la synthèse de la structure coiffée qui est remplacée par une structure IRES à l'extrémité 5'. Cette constatation nous a amené à vérifier les changements de conformation de la protéine en présence de  $Mg^{2+}$ . La technique utilisée pour vérifier ce changement de conformation est l'analyse de la protéine par le dichroïsme circulaire. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y pas un changement considérable au niveau de la structure secondaire et ce en analysant les spectres de la protéine en présence et en absence de  $Mg^{2+}$  à des longueurs d'ondes de 200 à 250 nm. Les spectres obtenus entre les longueurs d'ondes 250 et 300 nm renseignent sur les changements qui surviennent au niveau de la structure tertiaire de la protéine. Les résultats indiquent que la liaison du  $Mg^{2+}$  à la protéine n'affecte pas du tout sa structure tertiaire (Figure 4). Ceci suggère que la liaison de la protéine au  $Mg^{2+}$  induit un repositionnement des résidus dans le site catalytique et ne conduit pas à un changement de structure important.



**Figure 4 : Effet de la liaison du  $\text{Mg}^{2+}$  sur la structure de la protéine NS3.**

(A) Spectre de dichroïsme circulaire (CD) de la protéine NS3 (3.2  $\mu\text{M}$ ) en présence (ligne rouge) et en absence de  $\text{Mg}^{2+}$  (ligne noire). Les spectres ont été enregistrés entre la longueur d'ondes 200 et 250 nm. (B) Spectre de dichroïsme circulaire (CD) de la protéine NS3 (3.2  $\mu\text{M}$ ) en présence (ligne rouge) et en absence de  $\text{Mg}^{2+}$  (ligne noire). Les spectres ont été enregistrés entre la longueur d'ondes 250 et 300 nm.

En suite, nous nous sommes intéressés à la stabilité de la protéine lorsqu'elle est liée à son substrat : l'ATP. De ce fait, il est important de mentionner que certains enzymes gagnent de la stabilité en présence de co-facteurs et/ou de leur substrat. Ce qui est le cas de l'ARN- triphosphatase de *Saccharomyces cerevisiae* (Cet1), qui montre une meilleure stabilité, en liant les ions divalents qui agissent comme co-facteur (BISAILLON et BOUGIE, 2003). Les données de dénaturation chimique par le l'hydrochlorure de guanidium de la protéine en absence et en présence d'ATP fournis par des essais de spectroscopie à fluorescence montrent que la protéine n'est pas stabilisée par la liaison à l'ATP (Figure 5). Cette conclusion a été déduite suite à la comparaison des valeurs de  $C_m$  (Concentration de dénaturant requise pour la dénaturation de 50% de protéines) et de  $\Delta G_{Du}^{\circ}$  (Énergie libre de Gibbs en absence de dénaturant) qui ne montrent pas beaucoup de variation (Tableau II). Le même constat a été observé en effectuant le même test de dénaturation en présence de quantité saturante de  $Mg^{2+}$  ainsi que d'un analogue de l'ATP non hydrolysable (ATP- $\gamma$ -S), car en présence de l'ion  $Mg^{2+}$ , l'ATP est hydrolysé par la protéine alors qu'en utilisant l'ATP- $\gamma$ -S on mesure seulement l'attachement de la protéine au substrat. (Figure 6). Cette observation sur l'effet non-stabilisateur a été également confirmée par un test de dénaturation thermique détecté par le dichroïsme circulaire (Figure 7), qui appuie le fait que le  $Mg^{2+}$  seul ainsi que le  $Mg^{2+}$  combiné à ATP- $\gamma$ -S ne stabilise pas la protéine NS3, et ce en comparant les valeurs des  $T_m$  dont les variations ne sont pas significatives (Tableau IV).



**Figure 5. Dénaturation de la protéine NS3 au Gdm-HCl.**

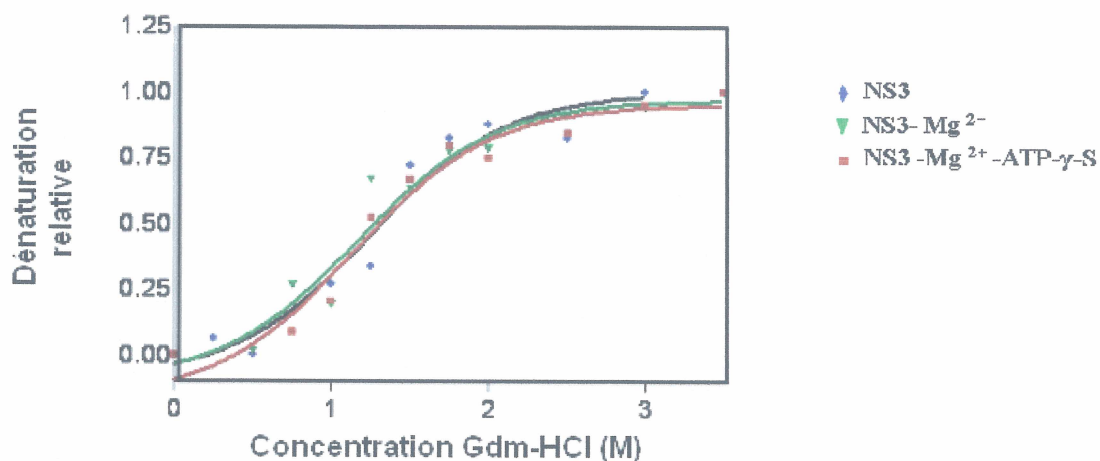
Spectre de dénaturation de la protéine NS3 seule au Gdm-HCl (ligne verte) et en présence de 1mM d'ATP (ligne noire) déterminés par spectroscopie à fluorescence

**Tableau II :**

**Paramètres thermodynamiques de dénaturation par Gdm-HCl**

Les paramètres  $\Delta G_{Du}^{\circ}$  (Énergie libre de Gibbs en absence de dénaturant),  $m$  (constante de coopérativité),  $C_m$  (Concentration de dénaturant requise pour la dénaturation de 50% de protéines) déterminés par la dénaturation de la protéine au Gdm-HCl et évalué par spectroscopie à fluorescence. Les différences des  $\Delta G_{Du}^{\circ}$  et  $C_m$  sont aussi calculées.

	$C_m$ (M)	$\Delta C_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{Du}^{\circ}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{Du}^{\circ}$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta \Delta G_{Du}^{\circ}$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
NS3	1.3	0.0	3.3	7.4	1.7	0.0
NS3-ATP	1.4	0.1	4.68	8.6	2	0.3



**Figure 6. Dénaturation au Gdm-HCl de la protéine NS3 en présence de  $Mg^{2+}$  et de l'ATP- $\gamma$ -P,  $Mg^{2+}$ .**

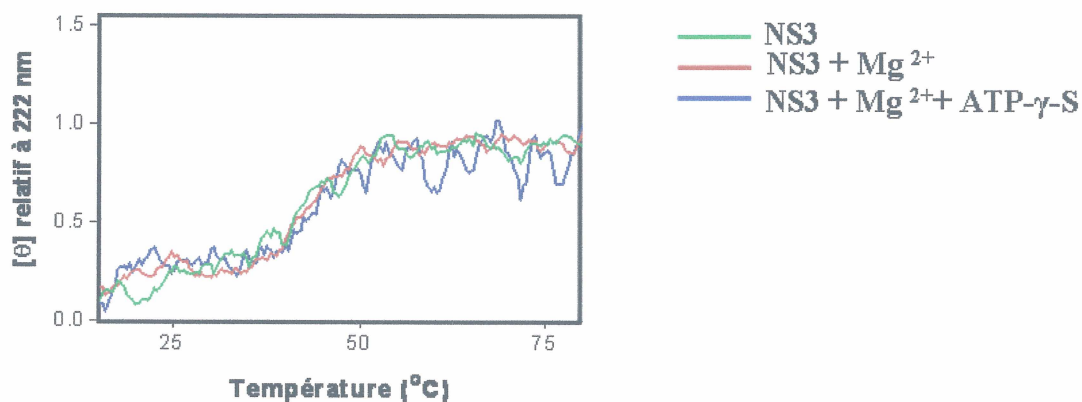
Spectre de dénaturation de la protéine NS3 seule au Gdm-HCl (ligne bleue), en présence de 5mM  $Mg^{2+}$  (ligne verte), et en présence de 1mM d'ATP- $\gamma$ -S et 5 mM  $Mg^{2+}$  (ligne rouge) déterminés par spectroscopie à fluorescence.

**Tableau III :**

**Paramètres thermodynamiques de dénaturation par Gdm-HCl**

Les paramètres  $\Delta G_{Du}^{\circ}$  (Énergie libre de Gibbs en absence de dénaturant),  $m$  (constante de coopérativité),  $C_m$  (Concentration de dénaturant requise pour la dénaturation de 50% de protéines) déterminés par la dénaturation de la protéine au Gdm-HCl et évalué par spectroscopie à fluorescence. Les différences des  $\Delta G_{Du}^{\circ}$  et  $C_m$  sont aussi calculées.

	$C_m$ (M)	$\Delta C_m$ (M)	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{Du}^{\circ}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{Du}^{\circ}$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta \Delta G_{Du}^{\circ}$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
NS3	1.3	0.0	3.3	7.4	1.7	0.0
NS3- $Mg^{2+}$	1.35	0.05	3.0	7.2	1.72	0.02
NS3- $Mg^{2+}$ -ATP- $\gamma$ -S	1.35	0.05	3.1	6.9	1.64	-0.056



**Figure 7. Dénaturation thermique de la protéine NS3**

Spectres de dénaturation thermique de la protéine NS3 (3.2  $\mu\text{M}$ ) (ligne verte) fournis par le dichroïsme circulaire, en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  (5mM), en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  (5mM) et l'ATP- $\gamma$ -S (1mM). Les spectres du dichroïsme circulaire ont été enregistrés à une longueur d'onde constante 222 nm à des différentes températures de 5 à 80°C.

**Tableau IV:**  
**Paramètres thermodynamiques de dénaturation de la protéine NS3 déterminés par dénaturation thermique**

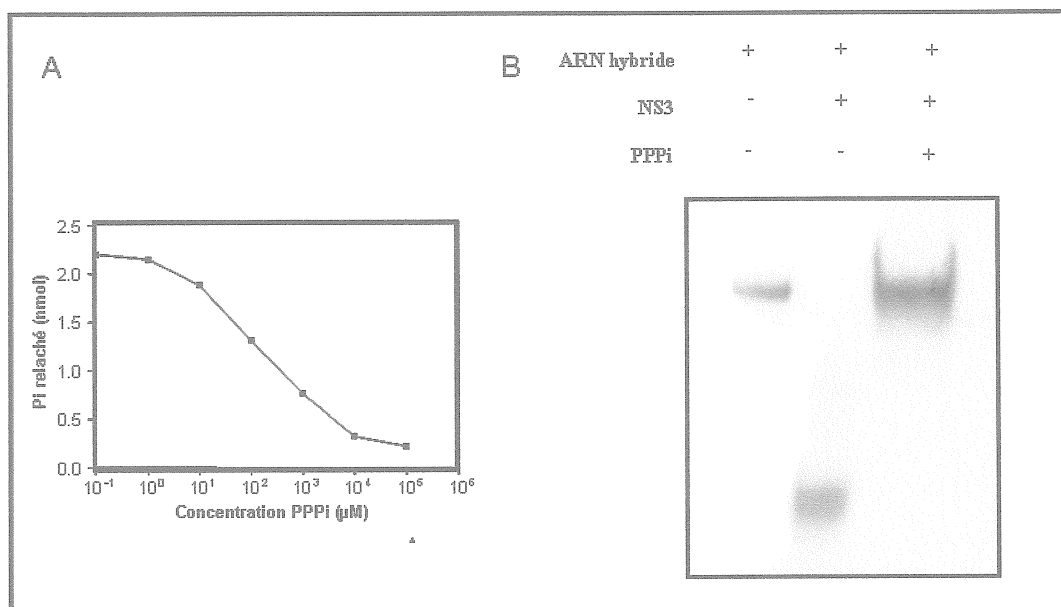
	<b><math>T_m</math> (°C)</b>
<b>NS3</b>	<b>40.92</b>
<b>NS3 - <math>\text{Mg}^{2+}</math></b>	<b>43.87</b>
<b>NS3-<math>\text{Mg}^{2+}</math>-ATP-<math>\gamma</math>-S</b>	<b>43.74</b>

Les  $T_m$  ont été déterminés par dénaturation thermique au dichroïsme circulaire de la protéine NS3 en absence et en présence de (5mM)  $\text{Mg}^{2+}$  et de (5mM)  $\text{Mg}^{2+}$ , (1mM) ATP- $\gamma$ -S

### 1.3. Inhibition de l'activité ATPase/hélicase de la protéine NS3

Les tests effectués sur l'inhibition de l'activité ARN-triphosphatase par le tripolyphosphate suggèrent que cette molécule pourrait éventuellement servir comme matrice pour développer des agents anti-viraux. En se basant sur cette observation, un essai d'inhibition de l'activité ATPase a été déterminé en présence de différentes concentrations de tripolyphosphate. Une inhibition de l'activité hélicase a été aussi observée en présence de l'inhibiteur (Figure 8). La courbe obtenue montre que l'activité ATPase est inhibée par le tripolyphosphate et requiert une concentration plus importante d'inhibiteur que l'activité ARN-triphosphatase. En outre, la valeur de  $K_i$  déterminée selon l'équation de Cheng-Prusoff est estimée à 7.1 mM. Cette valeur laisse suggérer que le tripolyphosphate est un inhibiteur peu efficace pour l'activité ATPase/hélicase. L'hypothèse qui peut être émise par rapport à ce constat, est que le tripolyphosphate semble être moins accessible à la protéine lorsqu'elle est liée au  $Mg^{2+}$ . Cependant, l'inhibition de l'activité hélicase par le tripolyphosphate suggère deux hypothèses: i) soit l'hydrolyse du tripolyphosphate ne procure pas assez d'énergie pour dérouler l'ARN double brin, sachant que certains ARN triphosphate ont la capacité d'hydrolyser de tripolyphosphate inorganique, notamment l'ARN triphosphatase du *tripanosome brucei* (GONG *et al.*, 2003) ; ii) soit le tripolyphosphate empêche la liaison de l'ATP à la protéine sans qu'il soit hydrolysé. De ce fait, l'inhibition de l'activité ARN-triphosphatase par le tripolyphosphate semble être plus efficace car cette activité ne nécessite pas la présence d'ions métalliques. De plus, on a pu observé un changement de conformation de la structure tertiaire de la protéine lorsqu'elle est liée à l'ARN. Ce changement de conformation pourrait rendre plus accessible la liaison de la protéine à l'inhibiteur. (BENZAGHOU *et al.*, 2006).





**Figure 8. Inhibition de l'activité ATPase et hélicase**

(A) Test ATPase en présence de tripolyphosphate. Le substrat utilisé pour la détermination de l'activité ATPase est l'ATP radiomarqué en phosphate  $\gamma$  incubé en présence de concentrations croissantes de tripolyphosphate et de NS3 (48 $\mu$ M) dans un tampon contenant 50mM de Tris-HCl, pH 7.5 et 5mM DTT, 5mM de  $Mg^{2+}$  pendant 60 minutes à 37°C (B) Test hélicase en présence de tripolyphosphate. Le substrat utilisé est l'ARN double brin ayant un brin radiomarqué de 20nt hybridé avec un brin de 50nt, ayant les extrémité 5'et 3'saillantes, incubé avec la protéine NS3 (48 $\mu$ M) pendant 60 min à 37°C. La réaction contient du Tris-HCl 50mM, 5mM DTT, 100 $\mu$ M ATP et 5mM  $Mg^{2+}$  en présence de 10mM de tripolyphosphate. Les produits des réactions ont été analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 15% non dénaturant.

## 2. Caractérisation de l'effet des ions métalliques sur la stabilité de la polymérase de l'hépatite C

Pour la plupart des polymérases de différents organismes identifiées, un motif conservé a été identifié dans leur séquence. Ces polymérases montrent une grande similitude structurale caractéristique des polymérases et comportent des résidus très conservés au niveau de leur site catalytique. Ces résidus, souvent des acides aspartiques, sont impliqués dans la coordination des ions divalents et le positionnement du substrat par rapport à l'enzyme. Dans le cadre de caractérisation de certains enzymes nécessitant des ions divalents pour assurer leur activité, les auteurs ont démontré l'importance de ces ions dans la stabilité de la structure de ces enzymes. L'exemple le plus pertinent est l'exemple de la phosphatase alcaline de *Escherichia coli* qui requiert des ions magnésium pour son activité et est stabilisé par la liaison de ces ions à son site catalytique (JANEWAY *et al.*, 1993).

Il a été établi dans des études antérieures que l'activité ARN polymérase du virus de l'hépatite C est supportée par les ions manganèse et magnésium et que la catalyse de l'enzyme se fait grâce à la liaison de ces ions au site catalytique (BEHRENS *et al.*, 1996 ; FERRARI *et al.*, 1999 ; LOHMAN *et al.*, 2000). Suite à ces observations, la question qui s'est posée est : Est-ce que, mis à part leur implication dans la catalyse, les ions divalents et notamment le  $Mg^{2+}$  assureraient la stabilité de l'enzyme ?

Au cours de nos études sur la protéine NS5B purifiée, qui avait pour objectif d'étudier le changement conformationnel de la protéine en solution ainsi que sa stabilité en présence de  $Mg^{2+}$ , et ce en utilisant la technique de la spectroscopie de fluorescence

et le dichroïsme circulaire, nous avons démontré que la polymérase NS5B subit un changement conformationnel suite à la liaison au  $Mg^{2+}$  et acquiert de la stabilité. De plus, des tests de mutagenèse ont permis d'appuyer l'identité des résidus impliqués dans la liaison au  $Mg^{2+}$  déjà proposé par le cristal (ARTICLE 2). Les tests de spectroscopie de fluorescence effectués, en présence de sonde fluorescente ANS (1-anilino-8-naphtalene-sulfonate), ont révélé que la liaison de l'ARN polymérase au magnésium induit une augmentation de l'exposition des poches hydrophobes. Ce changement conformationnel suggère que l'ARN polymérase du virus de l'hépatite C adopte une conformation favorable pour lier le substrat ou pour assurer d'autres fonctions. L'exposition des poches hydrophobes de la protéine NS5B, suite à la liaison au magnésium, pourrait aussi être impliquée dans les interactions avec des protéines virales et cellulaires pour former des complexes de réplication membranaires. D'ailleurs, il a été démontré que la protéine NS5B peut interagir avec la protéine NS3 et NS4B du virus de l'hépatite C qui modulent son activité. Donc, ce changement de conformation pourrait être éventuellement impliquées dans la modulation de l'activité de l'ARN polymérase (SHIROTA *et al.*, 2002).

De plus, nos tests de dénaturation chimiques ainsi que les tests de polymérisation ont démontré que le site catalytique est beaucoup plus sensible aux conditions de dénaturations que le reste de la protéine. Ceci signifie que la coordination de la liaison des ions métalliques par les acides aminés Asp220, Asp318 et Asp319, impliquant des liens hydrogènes et des interactions électrostatiques, est très sensible aux variations chimiques. En revanche, la structure globale de la protéine semble être moins sensible à ces mêmes variations. Cette observation couplée à des tests de mutagenèse des résidus impliqués dans la liaison des ions divalents, démontrent que la coordination des ions

divalents dans le site catalytique ne tolère aucune perturbation. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la liaison des ions métalliques qui génèrent une architecture active du site catalytique en stabilisant la nouvelle conformation.

Compte tenu de l'importance du rôle de la polymérase NS5B au cours de la réplication du virus, l'étude des changements structuraux de la protéine suite à la liaison aux substrats et aux autres protéines virales, sont nécessaires pour compléter les informations procurées par le cristal de la protéine et qui pourraient donner une meilleure compréhension du mécanisme.

Suite à ces études, il serait intéressant, en premier lieu, de déterminer le changement conformationnel de la protéine NS5B lorsqu'elle est liée à l'ARN génomique qui va servir comme amorce pour la synthèse de plusieurs copies de l'ARN. Cette étape de liaison de la protéine à l'ARN est cruciale pour la réplication du virus. En second lieu, il serait important d'étudier le changement conformationnel de la protéine qui survient suite à la liaison des nucléotides qu'elle recrute au fur et à mesure qu'elle réplique l'ARN. Pour répondre à ces questions, on pourrait procéder de la manière avec laquelle on a déterminé le changement conformationnelle en présence de  $Mg^{2+}$ , c'est-à-dire, utiliser la technique de la spectroscopie à fluorescence et le dichroïsme circulaire. De plus, par ces mêmes techniques on pourra aussi déterminer la stabilité de la protéine lorsqu'elle est liée à ses substrats (ARN et NTP).

En se fiant, aux résultats illustrés dans l'article, nous avons démontré qu'en présence d'ANS une sonde qui émet de la fluorescence lorsqu'elle est liée aux poches hydrophobes, la protéine liée au  $Mg^{2+}$  change de conformation en exposant des poches

hydrophobes (ARTICLE 2). Ces poches hydrophobes pourraient être impliquées dans les interactions avec d'autres protéines virales ou dans une la liaison à des protéines de membrane pour former un complexe de réplication membranaire. D'ailleurs, il a été déjà démontré que la protéine NS5B interagit avec la protéine NS3 ainsi que des protéines membranaires (ZHANG *et al.*, 2005 ; SALONEN *et al.*, 2005). À la lumière de cette constatation, nous pourrions caractériser ces interactions de la protéine NS5B avec les protéines virales en présence de quantité saturante de  $Mg^{2+}$  et ce en utilisant la technique de microcalorimétrie. Cette approche permet d'étudier les interactions entre les molécules en mesurant l'absorption ou le dégagement de la chaleur qui survient suite à leur liaison. La grande sensibilité du microcalorimètre permet de capter les changements de température infimes et permet l'obtention des données thermodynamiques qui permet d'évaluer les constantes d'équilibre, la stoechiométrie, et le profil thermodynamique de la réaction qui comprend l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ). Cette technique pourrait nous renseigner sur les propriétés des liaisons de NS5B- $Mg^{2+}$  aux autres protéines virales telles que les protéines NS3, NS4B et des protéines membranaires. Cette étude mettrait l'accent sur l'impact de la liaison de la protéine au  $Mg^{2+}$  dans la modulation de l'activité polymérase par la liaison des autres protéines virales.

## CONCLUSION

Concernant la caractérisation des différentes activités de la protéine NS3 du virus du Nil occidental, elle permet de mieux comprendre le mode de réplication du virus. Les données obtenues par ces études pourraient servir aussi à la perception du mode de réplication d'autres virus appartenants à la même famille tel que le virus de l'hépatite C qui infecte un plus grand nombre d'individus. Ainsi une seule stratégie virale pourrait être appliquée pour tout les virus appartenant à la famille des *Flavivirus*. De plus, en démontant l'importance des ions divalents dans la structure, la catalyse et la stabilité de la l'ARN polymérase du virus de l'hépatite C, nous avons pu cerner le rôle crucial des ions dans l'activité polymérase. Ceci a permis aussi d'avoir une meilleure idée sur le mécanisme catalytique. Les aboutissements de ces études pourraient déboucher au développement des stratégies antivirales et sauver éventuellement des individus atteints.

En conclusion, l'étude proposée ainsi que les perspectives permettraient une meilleure compréhension de l'activité des enzymes impliqués dans la réplication des virus appartenant à la famille des *Flavivirus*. En étudiant plus en profondeur les propriétés biochimiques des enzymes virales, on peut élucider leurs modes catalytiques et concevoir des molécules qui pourraient inhiber leurs activités et par conséquent empêcher la réplication des virus dans les cellules hôtes. Cette étude nous a aussi montré l'importance des ions divalents dans les mécanismes catalytique ainsi que leur fonctions dans la modulation des activités enzymatiques. Bien que ces travaux constituent une partie infime parmi l'ensemble des travaux menant à éclaircir le mode

de réplication des *Flavivirus*, ils apportent néanmoins des renseignements utiles et nécessaires pour trouver des moyens pour contrecarrer ces virus.

## RÉFÉRENCES

- Agence de santé publique du Canada.. *Le virus du nil occidental. rapport national de surveillance 2005*. ([http://www.phac-aspc.gc.ca/new\\_f.html](http://www.phac-aspc.gc.ca/new_f.html))
- Bartenschlager, R., Kaul, A., & Sparacio, S. (2003). Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Research*, 60(2), 91-102.
- Bartenschlager, R., & Lohmann, V. (2000). Replication of the hepatitis C virus. *Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 14(2), 241-254.
- Beaulieu, P. L. (2006). The discovery of finger loop inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: Status and prospects for novel HCV therapeutics. *IDrugs*, 9(1), 39-43.
- Benzaghoul, I., Bougie, I., Picard-Jean, F., & Bisaillon, M. (2006). Energetics of RNA binding by the West Nile virus RNA triphosphatase. *FEBS letter*, 580(3):867-77
- Behrens, S. E., Tomei, L., and De Francesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15(1), 12-22.
- Berthet, F. X., Zeller, H. G., Drouet, M. T., Rauzier, J., Digoutte, J. P., & Deubel, V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope



- glycoprotein gene of euro-african west nile viruses. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 9), 2293-2297.
- Bisaillon, M., Bougie, I. (2003). Investigating the role of metal ions in the catalytic mechanism of the yeast RNA triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36),33963-71.
- Bisaillon, M., & Lemay, G. (1999). Computational sequence analysis of mammalian reovirus proteins. *Virus Genes*, 18(1), 13-37.
- Bisaillon, M., & Lemay, G. (1997). Characterization of the reovirus lambda 1 protein RNA 5'-triphosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 272(47), 29954-7.
- Both, G. W., Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., & Shatkin, A. J. (1976). Effect of 5'-terminal structure and base composition on polyribonucleotide binding to ribosomes. *Journal of Molecular Biology*, 104(3), 637-658.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F. A., & De Francesco, R. (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *Journal of Virology*, 76(7), 3482-3492.
- Brinton, M. A. (2002). The molecular biology of west nile virus: A new invader of the western hemisphere. *Annual Review of Microbiology*, 56, 371-402.

- Brinton, M. A. (1982). Characterization of west nile virus persistent infections in genetically resistant and susceptible mouse cells. I. generation of defective nonplaquing virus particles. *Virology*, 116(1), 84-98.
- Brinton, M. A., Fernandez, A. V., & Dispoto, J. H. (1986). The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology*, 153(1), 113-121.
- Buckley, A., Gaidamovich, S., Turchinskaya, A., & Gould, E. A. (1992). Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells. *The Journal of General Virology*, 73(Pt 5), 1125-1130.
- Calero, G., Wilson KF., Ly, T., Rios-Steiner, JL., Clardy, JC., Cerione, RA. (2002). Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nature: Structural Biology*, 9(12):912-917.
- Chambers, T. J., Nestorowicz, A., Amberg, S. M., & Rice, C. M. (1993). Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *Journal of Virology*, 67(11), 6797-6807.
- Cho, E., Tagaki, T., Moore, C., Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA

- polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes and developments*, 11(24), 3319-3326.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359-362.
- Chu, J. J., & Ng, M. L. (2004). Interaction of west nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54533-54541.
- Cleaves, G. R., & Dubin, D. T. (1979). Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology*, 96(1), 159-165.
- Cramer, J., Jaeger, J., & Restle, T. (2006). Biochemical and pre-steady-state kinetic characterization of the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B $\Delta$ 21, HC-J4). *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, 45(11), 3610-3619.
- Cui, T., Sugrue, R. J., Xu, Q., Lee, A. K., Chan, Y. C., & Fu, J. (1998). Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*, 246(2), 409-417.
- D'arcy, A., Chaillet, M., Schiering, N., Villard, F., Lim, SP., Lefeuvre, P., Erbel, P. (2006). Purification and crystallization of dengue and West Nile virus NS2B-NS3

complexes. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 1;62(Pt 2):157-62.

Diamond, M. S. (2003). Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunology and Cell Biology*, 81(3), 196-206.

Diamond, M. S., Sitati, E. M., Friend, L. D., Higgs, S., Shrestha, B., & Engle, M. (2003). A critical role for induced IgM in the protection against west nile virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1853-1862.

Dumont, S., Cheng, W., Serebrov, V., Beran, R. K., Tinoco, I., Jr, & Pyle, A. M. et al. (2006). RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature*, 439(7072), 105-108.

Engle, M. J., & Diamond, M. S. (2003). Antibody prophylaxis and therapy against west nile virus infection in wild-type and immunodeficient mice. *Journal of Virology*, 77(24), 12941-12949.

Esteban, J. I., Lopez-Talavera, J. C., Genesca, J., Madoz, P., Viladomiu, L., & Muniz, E. et al. (1991). High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Annals of Internal Medicine*, 115(6), 443-449.

Failla, C., Tomei, L., & De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*, 68(6), 3753-3760.

- Failla, C., Tomei, L., & De Francesco, R. (1994). Both NS3 and NS4A are required for proteolytic processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*, 68(6), 3753-3760.
- Falgout, B., Miller, R. H., & Lai, C. J. (1993). Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *Journal of Virology*, 67(4), 2034-2042.
- Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang, J. W., Baroudy, B. M., Lau, J. Y., and Hong, Z. (1999). Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 73(2), 1649-1654.
- Flint, M., Thomas, J. M., Maidens, C. M., Shotton, C., Levy, S., & Barclay, W. S. et al. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *Journal of Virology*, 73(8), 6782-6790.
- Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., & Shatkin, A. J. (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 5043-5053.
- Gale, M., Jr., & Foy, E. M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, 436(7053), 939-945. Gallivan JP, McGarvey MJ
- Gallivan, JP., McGarvey, MJ. (2003). The importance of the Q motif in the ATPase activity of a viral helicase. *FEBS Letter* 554(3):485-8.

- Garen, A., & Levinthal, C. (1960). A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. I. purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 38, 470-483.
- Gingras, AC., Raught, B., Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*. 68, 913-963.
- Gong, C., Martins, A., & Shuman, S. (2003). Structure-function analysis of trypanosoma brucei RNA triphosphatase and evidence for a two-metal mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50843-50852.
- Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S. M., & Rice, C. M. (1993). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(22), 10583-10587.
- Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D., & Harris, M. (2005). Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes. *Journal of Virology*, 79(24), 15525-15536.
- Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. *Advances in Virus Research*, 59, 63-97.

Heinz, F. X., & Allison, S. L. (2000). Structures and mechanisms in flavivirus fusion.

*Advances in Virus Research*, 55, 231-269.

Herzer, K., Weyer, S., Krammer, P. H., Galle, P. R., & Hofmann, T. G. (2005).

Hepatitis C virus core protein inhibits tumor suppressor protein promyelocytic leukemia function in human hepatoma cells. *Cancer Research*, 65(23), 10830-10837.

Ho, C. K., Pei, Y., & Shuman, S. (1998). Yeast and viral RNA 5' triphosphatases

comprise a new nucleoside triphosphatase family. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34151-34156.

Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C., Amphlett, E., Clarke, B., & Rowlands, D. et

al. (1996). Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, 222(1), 31-42.

Houghton, M. (1996). In *Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M.,

*Eds*), , 1035-1058.

Hunsperger, E., & Roehrig, J. T. (2005). Characterization of west nile viral replication

and maturation in peripheral neurons in culture. *Journal of Neurovirology*, 11(1), 11-22.

Janeway, C. M. L., Xu, X., Murphy, J. E., Chaidaroglou, A., and Kantrowitz, E. R.

(1993). Magnesium in the active site of Escherichia coli alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* 32(6), 1601-1609

Kadare, G., & Haenni, A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *Journal of Virology*, 71(4), 2583-2590.

Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., & Konishi, M. et al. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *The Journal of General Virology*, 75(Pt 7), 1755-1760.

Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K. E., & Padmanabhan, R. (1995). Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 19100-19106.

Kawakami, K., Mizumoto, K., Ishihama, A., Shinozaki-Yamaguchi, K., & Miura, K. (1985). Activation of influenza virus-associated RNA polymerase by cap-1 structure (m7GpppNm). *Journal of Biochemistry*, 97(2), 655-661.

Kaye K, Mojica AM. *West nile virus-a briefing*.

<http://www.ci.nyc.ny.us/html/doh/pdf/chi/chi19-1.pdf>



- Kesson, A. M., & King, N. J. (2001). Transcriptional regulation of major histocompatibility complex class I by flavivirus west nile is dependent on NF-kappaB activation. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 947-954.
- Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., Sedlak, P. L., & Westaway, E. G. (2001). Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: Evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of kunjin virus. *Journal of Virology*, 75(10), 4633-4640.
- Kyono, K., Miyashiro, M., & Taguchi, I. (2003). Characterization of ATPase activity of a Hepatitis C Virus NS3 Helicase Domain, and Analysis Involving mercuric Reagents. *Journal of Biochemistry*, 134(4), 505-511.
- Lam, A., Keeney, D., Eckert, P.Q., & Frick, D.N. (2003). Hepatitis C virus NS3 ATPases/helicases from different genotypes exhibit variations in enzymatic properties. *Journal of Virology* 77(7)3950-61.
- Lee, S. H., Kim, Y. K., Kim, C. S., Seol, S. K., Kim, J., & Cho, S. et al. (2005). E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. 1950)*, 175(12), 8226-8235.
- Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., & Weber, P. C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis

C virus reveals a fully encircled active site. *Nature Structural Biology*, 6(10), 937-943.

Lesburg, C. A., Radfar, R., & Weber, P. C. (2000). Recent advances in the analysis of HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Current Opinion in Investig Drugs (London, England : 2000)*, 1(3), 289-296.

Lewis, J. D., & Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 247(2), 461-469.

Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *Journal of Virology*, 73(6), 4611-4621.

Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), 110-113.

Lohmann, V., Roos, A., Korner, F., Koch, J. O., and Bartenschlager R. (2000) Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *J. Viral Hepatitis* 7(3), 167-174.

Luongo, C. L., Contreras, C. M., Farsetta, D. L., & Nibert, M. L. (1998). Binding site for S-adenosyl-L-methionine in a central region of mammalian reovirus lambda2

- protein. evidence for activities in mRNA cap methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 23773-23780.
- Mao, X., Schwer, B., & Shuman, S. (1995). Yeast mRNA cap methyltransferase is a 50-kilodalton protein encoded by an essential gene. *Molecular and Cellular Biology*, 15(8), 4167-4174.
- Mao, X., & Shuman, S. (1996). Vaccinia virus mRNA (guanine-7-)methyltransferase: Mutational effects on cap methylation and AdoHcy-dependent photo-cross-linking of the cap to the methyl acceptor site. *Biochemistry (John Wiley & Sons)*, 35(21), 6900-6910.
- Mason, P. W. (1989). Maturation of japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*, 169(2), 354-364.
- McCormick, C. J., Brown, D., Griffin, S., Challinor, L., Rowlands, D. J., & Harris, M. (2006). A link between translation of the hepatitis C virus polyprotein and polymerase function; possible consequences for hyperphosphorylation of NS5A. *The Journal of General Virology*, 87(Pt 1), 93-102.
- McIntosh, B. M., Jupp, P. G., Dos Santos, I. S., & Meenehan, G. M. (1976). *Culex* (eumelanomyia) rubinotus theobald as vector of banzi, germiston and witwatersand viruses. I. isolation of virus from wild populations of *C. rubinotus*. *Journal of Medical Entomology*, 12(6), 637-640.

- Mizumoto, K., & Kaziro, Y. (1987). Messenger RNA capping enzymes from eukaryotic cells. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 34, 1-28.
- Momburg, F., Mullbacher, A., & Lobigs, M. (2001). Modulation of transporter associated with antigen processing (TAP)-mediated peptide import into the endoplasmic reticulum by flavivirus infection. *Journal of Virology*, 75(12), 5663-5671.
- Moss, B., Gershowitz, A., Wei, C. M., & Boone, R. (1976). Formation of the guanylated and methylated 5'-terminus of vaccinia virus mRNA. *Virology*, 72(2), 341-351.
- Ng, M. L., Tan, S. H., & Chu, J. J. (2001). Transport and budding at two distinct sites of visible nucleocapsids of west nile (sarafend) virus. *Journal of Medical Virology*, 65(4), 758-764.
- Nowak, T., Farber, P. M., Wengler, G., & Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of west nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, 169(2), 365-376.

- Pei, Y., Schwer, B., Hausmann, S., and Shuman, S. (2001). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* RNA triphosphatase. *Nucleic Acids Res.* 29, 387-396.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F. A., Moradpour, D., & Pawlotsky, J. M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(1), 5-19.
- Perry, R. P. (1981). RNA processing comes of age. *The Journal of Cell Biology*, 91(3 Pt 2), 28s-38s.
- Pieroni, L., Santolini, E., Fipaldini, C., Pacini, L., Migliaccio, G., & La Monica, N. (1997). In vitro study of the NS2-3 protease of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 71(9), 6373-6380.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., & Petracca, R. et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282(5390), 938-941.
- Ramanathan, M. P., Chambers, J. A., Pankhong, P., Chattergoon, M., Attatippaholkun, W., & Dang, K. et al. (2006). Host cell killing by the west nile virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology*, 345(1), 56-72.
- Reed, K. E., Gorbalenya, A. E., & Rice, C. M. (1998). The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *Journal of Virology*, 72(7), 6199-6206.

- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., & Strauss, J. H. (1985). Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229(4715), 726-733.
- Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., & Sonenberg, N. (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Molecular and Cellular Biology*, 10(3), 1134-1144.
- Salonen, A., Ahola, T., & Kaariainen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 285, 139-173.
- Sarbah, S. A., & Younossi, Z. M. (2000). Hepatitis C: An update on the silent epidemic. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 30(2), 125-143.
- Shirota, Y., Luo, H., Qin, Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., and Murakami, S. (2002). Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 277(13), 11149-11155.
- Scherret, J. H., Poidinger, M., Mackenzie, J. S., Broom, A. K., Deubel, V., & Lipkin, W. I. et al. (2001). The relationships between west nile and kunjin viruses. *Emerging Infectious Diseases (Print)*, 7(4), 697-705.

- Shrestha, B., Gottlieb, D., & Diamond, M. S. (2003). Infection and injury of neurons by west nile encephalitis virus. *Journal of Virology*, 77(24), 13203-13213.
- Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 21(2), 570-583.
- Smith, G. W., & Wright, P. J. (1985). Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and aedes albopictus cells. *The Journal of General Virology*, 66(Pt 3), 559-571.
- Tai., C-L., Chi, W-K., Chen, & Hwang, L-H. (1996). The Helicase Activity Associated with Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 (NS3). *Journal of Virology*, 70(12), 8477-8486.
- Thibeault, D., Maurice, R., Pilote, L., Lamarre, D., & Pause, A. (2001). In vitro characterization of a purified NS2/3 protease variant of hepatitis C virus. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46678-46684.
- Tsukamoto, T., Shibagaki, Y., Imajoh-Ohmi, S., Murakoshi, T., Suzuki, M., & Nakamura, A. et al. (1997). Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5'-triphosphatase, which is essential for cell viability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(1), 116-122.

- Uchil, PD., Kumar, AV., Satchidanandam, V. (2006). Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *Journal of Virology*, 80(11), 5451-64.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P., & Kaariainen, L. (2000). Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17281-17287.
- Von der Harr, T., Oku, Y., Ptushkina, M., Moerke, N., Wagner, G., Gross, JD., McCathy, JE. (2006). Folding transitions during assembly of the eukaryotic mRNA cap-binding complex. *Journal of Molecular Biology*, 356(4), 982-92.
- Wang, S. P., Deng, L., Ho, C. K., & Shuman, S. (1997). Phylogeny of mRNA capping enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9573-9578.
- Wang, Y., Lobigs, M., Lee, E., & Mullbacher, A. (2003). CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in west nile virus encephalitis. *Journal of Virology*, 77(24), 13323-13334.
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C., & Darke, P. L. (2001). Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13931-13935.



- Wengler, G., & Wengler, G. (1989). Cell-associated west nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *Journal of Virology*, 63(6), 2521-2526.
- Wengler, G., & Wengler, G. (1981). Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus west nile virus: Absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology*, 113(2), 544-555.
- Wengler, G., & Wengler, G. (1991). The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology*, 184 (2), 707-715.
- Wu, J. Z., Yao, N., Walker, M., & Hong, Z. (2005). Recent advances in discovery and development of promising therapeutics against hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Mini Rev.Med.Chem.*, 5(12), 1103-1112.
- Zhang, C., Cai, Z., Kim, Y. C., Kumar, R., Yuan, F., & Shi, P. Y. et al. (2005). Stimulation of hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 3 (NS3) helicase activity by the NS3 protease domain and by HCV RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology*, 79(14), 8687-8697.